

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
7 décembre 2000 (07.12.2000)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 00/73266 A1

(51) Classification internationale des brevets:
C07C 327/30, 327/34, A61K
31/265, A61P 31/18, A61K 7/06, 7/48

(21) Numéro de la demande internationale:
PCT/FR00/01447

(22) Date de dépôt international: 26 mai 2000 (26.05.2000)

(25) Langue de dépôt: français

(26) Langue de publication: français

(30) Données relatives à la priorité:
99/06708 27 mai 1999 (27.05.1999) FR

F-34070 Montpellier (FR). PUY, Jean-Yves [FR/FR];
Résidence Le Gauvain A1, 75, avenue du Pont Trin-
quat, F-34000 Montpellier (FR). IMBACH, Jean-Louis
[FR/FR]; 91, impasse de Luques, F-34000 Montpellier
(FR). CLAYETTE, Pascal [FR/FR]; 17, rue Edmé Fremy,
F-78000 Versailles (FR). FRETIER, Philippe [FR/FR];
20, avenue Duvelleroy, F-94130 Nogent-sur-Marne (FR).

(74) Mandataires: MARTIN, Jean-Jacques etc.; Cabinet
Regimbeau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR).

(81) États désignés (national): CA, JP, US.

(84) États désignés (régional): brevet européen (AT, BE, CH,
CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT,
SE).

(71) Déposants (pour tous les États désignés sauf US):
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCI-
ENTIFIQUE (CNRS) [FR/FR]; 3, rue Michel-Ange,
F-75794 Paris Cedex 16 (FR). COMMISSARIAT A
L'ÉNERGIE ATOMIQUE [FR/FR]; 31-33, rue de la
Fédération, F-75015 Paris (FR).

Publiée:

— Avec rapport de recherche internationale.
— Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des
revendications, sera republiée si des modifications sont
reçues.

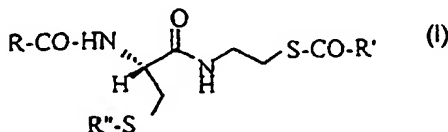
(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement): OIRY,
Joël [FR/FR]; Lot Château Bon, 40, place Gaby Morlay,

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrévia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.

(54) Title: NOVEL ANTIOXIDANTS, PREPARATION METHODS AND USES

(54) Titre: NOUVEAUX ANTIOXYDANTS, PROCÉDES DE PRÉPARATION ET UTILISATIONS



(57) Abstract: The invention concerns compounds of general formula (I) (wherein R and R' represent an alkyl radical or an aryl group and R'' is hydrogen or a CO-R¹ group wherein R¹ is an alkyl radical or an aryl group; and the dimers formed by the disulphide bond from one and/or the other of the two sulphur atoms of the compounds of general formula (I); and the corresponding thiazolidin forms), the methods for preparing them and uses thereof. More particularly, it concerns the use of said compounds as antioxidant agents, in particular for preparing medicines designed to increase the intracellular and/or extracellular level of glutathione (GSH).

(57) Abrégé: La présente invention concerne des composés de formule générale (I) (dans laquelle R et R' représentent un radical alkyle ou un groupe aryle et R'' est l'hydrogène ou un groupe CO-R¹ dans lequel R¹ est un radical alkyle ou un groupe aryle; ainsi que les dimères formés par un pont disulfure partant de l'un et/ou l'autre des deux atomes de soufre des composés de formule générale I; ainsi que les formes thiazolidines correspondantes), leurs procédés de préparation ainsi que leurs utilisations. Elle concerne plus particulièrement l'utilisation de ces composés en tant qu'agents antioxydants, notamment pour la préparation de médicaments destinés à augmenter le taux intracellulaire et/ou extracellulaire de glutathion (GSH).

WO 00/73266 A1

NOUVEAUX ANTIOXYDANTS, PROCÉDES DE PRÉPARATION ET UTILISATIONS.

5 La présente invention concerne de nouveaux composés à activité antioxydante, leurs procédés de préparation et leurs utilisations notamment pour la préparation de médicaments destinés à augmenter le taux intracellulaire et/ou extracellulaire de glutathion (GSH).

De plus en plus de travaux montrent que les espèces réactives de
10 l'oxygène jouent un rôle important dans de multiples processus biologiques et notamment dans le développement de multiples pathologies humaines et plus particulièrement dans les infections rétrovirales par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH).

Les espèces réactives de l'oxygène (ERO, ion superoxyde, peroxyde
15 d'hydrogène, ion hypochloreux, radicaux hydroxyles, etc...) sont des produits naturels dont l'origine est variable; elles proviennent des cellules inflammatoires activées, des cellules métabolisant des xénobiotiques ou des cellules exposées à des milieux environnementaux particuliers tels la fumée de cigarette.

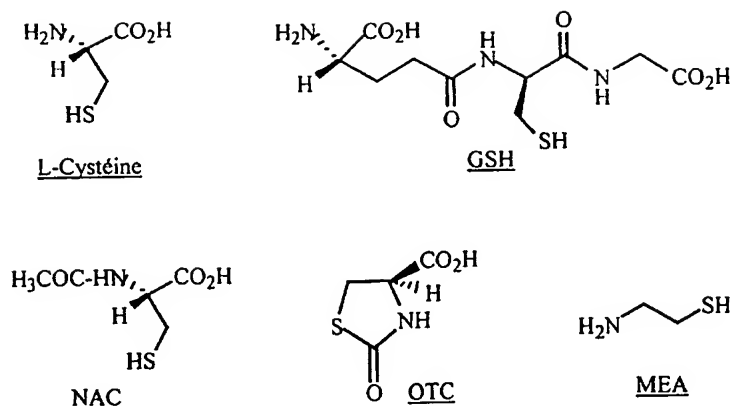
20 Diverses substances sont connues pour avoir une activité de piègeur de ces espèces réactives de l'oxygène au niveau intracellulaire ou extracellulaire.

On peut citer par exemple le glutathion qui est un tripeptide (L- γ -glutamyl-L-cystéinyglycine, GSH) trouvé dans toutes les cellules
25 eucaryotes. Il est synthétisé et dégradé dans la cellule, principalement via sa forme réduite, le GSH. Ce tripeptide réduit, qui prend part à de nombreuses fonctions cellulaires comme par exemple, la synthèse protéique et nucléique, et le transport d'acides aminés, constitue le principal mécanisme de défense intracellulaire contre le stress oxydatif.

30 Les facteurs qui favorisent la formation d'espèces réactives de l'oxygène conduisent à la consommation des réserves de glutathion.

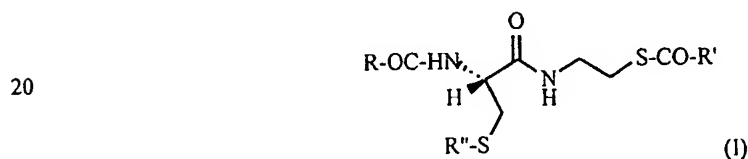
La N-acétyl-L-cystéine (NAC) est connue depuis de nombreuses années comme médicament pour la cornée, comme antidote à l'empoisonnement par l'acétaminophène et comme agent mucolytique en coupant les liaisons disulfures dans les mucoprotéines. Parce que la NAC est utilisée thérapeutiquement dans de multiples pathologies dans lesquelles les oxydants semblent jouer un rôle, il a été suggéré qu'elle fonctionne comme un antioxydant. Le mécanisme d'action de la NAC repose sur son aptitude à réduire la cystine extracellulaire en cystéine ou à être une source de métabolites SH (fonction thiol). Comme source de groupes SH, la NAC stimule la synthèse de GSH, augmente l'activité glutathione-S-transférase, favorise la détoxification et agit directement sur les espèces oxydantes réactives. La NAC et par extension les variants acylés de l'acide aminé L-cystéine sont une excellente source de groupes SH et sont convertis dans l'organisme en métabolites capables de stimuler la synthèse de glutathion, favorisant ainsi la détoxification et agissant directement comme piègeurs d'espèces réactives de l'oxygène.

Compte-tenu du rôle central du GSH dans les mécanismes de détoxification cellulaire, de nombreuses alternatives visant à remonter son taux intracellulaire ont été envisagées comme stratégie thérapeutique adjuvante dans de nombreuses pathologies humaines et plus particulièrement dans l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) au cours des dernières années (WO 92/21368; WO 95/10268; US 4 927 808; US 5 580 577). Tout d'abord, les approches ont cherché à supplémenter la molécule déficiente. Elles ont ensuite visé à alimenter le cycle du γ -glutamyl. Ainsi, la L-cystéine, le GSH lui-même, la NAC, l'acide 2-oxothiazolidine-4(R)-carboxylique (OTC), et la cystéamine (MEA), dont les formules sont reproduites ci-après, ont été testés comme adjuvants potentiels aux antirétroviraux dans le traitement des infections par le VIH.



Les effets bénéfiques de ces molécules ont été limités *in vivo* par
 5 une faible biodisponibilité, une métabolisation trop rapide, et des
 concentrations administrables insuffisantes. La NAC par exemple est
 une molécule relativement labile qui, lors de sa rapide dégradation,
 relargue des composés contenant des sulfures malodorants tels l' H_2S .
 Ce problème d'instabilité a limité l'utilisation de la NAC, ou d'autres
 10 composés fournisseurs d'une source de -SH , tels que la L-cystéine ou
 ses variants acylés, pour la préparation de formulations utilisables en
 pharmacie, dermatologie ou cosmétique.

Les inventeurs ont maintenant mis au point de nouveaux
 composés, susceptibles d'agir sur le taux intracellulaire ou
 15 extracellulaire de glutathion, qui ne présentent pas l'instabilité qui a été
 constatée pour les produits connus. C'est pourquoi, la présente
 invention a pour objet les composés de formule générale (I) suivante:



et dans laquelle:

- 25 - R et R' représentent indépendamment un radical alkyle en $\text{C}_1\text{-C}_7$,
 linéaire ou ramifié, ou un groupe aryle non substitué ou substitué
 par un ou plusieurs radicaux choisis parmi les halogènes, les

radicaux alkyles en C₁-C₃ linéaires ou ramifiés, et les radicaux -OH (hydroxyle).

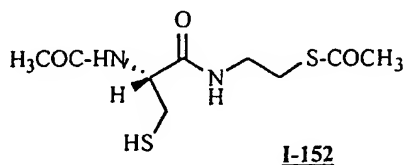
- R'' est l'hydrogène ou un groupe CO-R¹ dans lequel R¹ est un radical alkyle en C₁-C₇ linéaire ou ramifié, ou un groupe aryle non substitué ou substitué par un ou plusieurs radicaux choisis parmi les halogènes, les radicaux alkyles en C₁-C₃ linéaires ou ramifiés, et les radicaux -OH ;

ainsi que les dimères formés par un pont disulfure à partir de l'un et/ou l'autre des deux atomes de soufre de la molécule de formule générale I constitué par les radicaux R'' ou par les radicaux R'CO- des deux molécules ainsi que les formes thiazolidines correspondantes.

De préférence, les radicaux alkyles R, R' et R'' sont en C₁-C₃. Les halogènes sont de préférence le chlore et le fluor.

Dans ces composés, la NAC et la MEA sont associées et protégées ou non par des groupements biolabiles.

Selon un mode préféré de réalisation, la présente invention concerne un composé de formule générale I tel que R est un groupe méthyle (-CH₃). Dans un mode plus préféré de réalisation, la présente invention concerne un composé de formule générale I tel que R et R' sont des groupes méthyles (-CH₃). Dans le mode préféré de réalisation, l'invention concerne le composé dénommé N-(N-acétyl-L-cystéinyl)-S-acétylcystéamine appelé ci-après **I-152**, tel que, dans la formule générale I, R et R' sont des groupes méthyles (-CH₃) et R'' est l'hydrogène.



Ce composé est particulièrement intéressant pour ses propriétés qui le rendent actif pour le traitement et/ou la prévention de pathologies ou de troubles liés à une déplétion en glutathion intra et/ou

extracellulaire, notamment le traitement des infections virales et plus particulièrement les infections par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH).

Selon un autre mode préféré de réalisation, l'invention concerne le composé dénommé N-(N,S-Bis-acétyl-L-cystéinyl)-S-acétylcystéamine, appelé ci-après **I-176**, tel que, dans la formule générale I, R et R' sont des groupes méthyles (-CH₃) et R'' est un groupe acétyle (-COCH₃).

Selon un autre mode préféré de réalisation, l'invention concerne le composé dénommé N-(N-acétyl-S-isobutyryl-L-cystéinyl)-S-acétylcystéamine, appelé ci-après **I-177**, tel que dans la formule générale I, R et R' sont des groupes méthyles (-CH₃) et R'' est un groupe isobutyryle (-COCH(CH₃)₂).

Selon un autre mode préféré de réalisation, l'invention concerne le composé dénommé N-(N-acétyl-S-pivaloyl-L-cystéinyl)-S-acétylcystéamine, appelé ci-après **I-178**, tel que dans la formule générale I, R et R' sont des groupes méthyles (-CH₃) et R'' est un groupe pivaloyle (-COC(CH₃)₃).

C'est également un des objets de la présente invention de fournir un composé de formule générale I dans lequel R est un groupe méthyle (-CH₃) et R' est sélectionné parmi le groupe isopropyle (-CH(CH₃)₂), tertibutyle (-C(CH₃)₃) et phényle (-C₆H₅); un tel composé présente de préférence un groupe R'' sélectionné parmi l'hydrogène (-H), le groupe acétyle (-COCH₃), le groupe isobutyryle (-COCH(CH₃)₂), le groupe pivaloyle (-COC(CH₃)₃), le groupe benzoyle (-CO-C₆H₅). Plus particulièrement l'invention vise à fournir le composé ci-après dénommé:

- **I-188** tel que dans la formule générale I, R est un groupe méthyle (-CH₃), R' est un groupe isopropyle (-CH(CH₃)₂) et R'' est l'hydrogène (-H).
- **I-189** tel que dans la formule générale I, R est un groupe méthyle (-CH₃), R' est un groupe isopropyle (-CH(CH₃)₂) et R'' est le groupe acétyle (-COCH₃).

- **I-190** tel que dans la formule générale I, R est un groupe méthyle ($-\text{CH}_3$), R' est un groupe isopropyle ($-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$) et R'' est le groupe isobutyryle ($-\text{COCH}(\text{CH}_3)_2$).
- **I-191** tel que dans la formule générale I, R est un groupe méthyle ($-\text{CH}_3$), R' est un groupe isopropyle ($-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$) et R'' est le groupe pivaloyl ($-\text{COC}(\text{CH}_3)_3$).
- **I-192** tel que dans la formule générale I, R est un groupe méthyle ($-\text{CH}_3$), R' est un groupe isopropyle ($-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$) et R'' est le groupe benzoyl ($-\text{CO}-\text{C}_6\text{H}_5$).
- **I-193** tel que dans la formule générale I, R est un groupe méthyle ($-\text{CH}_3$), R' est un groupe tertiobutyle ($-\text{C}(\text{CH}_3)_3$) et R'' est l'hydrogène ($-\text{H}$).
- **I-194** tel que dans la formule générale I, R est un groupe méthyle ($-\text{CH}_3$), R' est un groupe tertiobutyle ($-\text{C}(\text{CH}_3)_3$) et R'' est le groupe acétyl ($-\text{COCH}_3$).
- **I-195** tel que dans la formule générale I, R est un groupe méthyle ($-\text{CH}_3$), R' est un groupe tertiobutyle ($-\text{C}(\text{CH}_3)_3$) et R'' est le groupe isobutyryl ($-\text{COCH}(\text{CH}_3)_2$).
- **I-196** tel que dans la formule générale I, R est un groupe méthyle ($-\text{CH}_3$), R' est un groupe tertiobutyle ($-\text{C}(\text{CH}_3)_3$) et R'' est le groupe pivaloyl ($-\text{COC}(\text{CH}_3)_3$).
- **I-197** tel que dans la formule générale I, R est un groupe méthyle ($-\text{CH}_3$), R' est un groupe tertiobutyle ($-\text{C}(\text{CH}_3)_3$) et R'' est le groupe benzoyl ($-\text{CO}-\text{C}_6\text{H}_5$).
- **I-198** tel que dans la formule générale I, R est un groupe méthyle ($-\text{CH}_3$), R' est un groupe phényle ($-\text{C}_6\text{H}_5$) et R'' est l'hydrogène ($-\text{H}$).
- **I-199** tel que dans la formule générale I, R est un groupe méthyle ($-\text{CH}_3$), R' est un groupe phényle ($-\text{C}_6\text{H}_5$) et R'' est le groupe acétyl ($-\text{COCH}_3$).
- **I-200** tel que dans la formule générale I, R est un groupe méthyle ($-\text{CH}_3$), R' est un groupe phényle ($-\text{C}_6\text{H}_5$) et R'' est le groupe isobutyryl ($-\text{COCH}(\text{CH}_3)_2$).

- **I-201** tel que dans la formule générale I, R est un groupe méthyle (-CH₃), R' est un groupe phényle (-C₆H₅) et R'' est le groupe pivaloyle (-COC(CH₃)₃).
- **I-202** tel que dans la formule générale I, R est un groupe méthyle (-CH₃), R' est un groupe phényle (-C₆H₅) et R'' est le groupe benzoyle (-CO-C₆H₅).

C'est également un des objets de la présente invention de fournir un composé de formule générale I qui constitue un intermédiaire dans la synthèse du composé I-152, de ses dérivés acylés ou de ses analogues. Ainsi, l'invention concerne également le composé de formule générale I dénommé **10** dans lequel R est un groupe méthyle (-CH₃), R' est le groupe isopropyle (-CH(CH₃)₂) et R'' est un groupe trityl. L'invention concerne également le composé de formule générale I dénommé **11** dans lequel R est un groupe méthyle (-CH₃), R' est le groupe tertibutyle (-C(CH₃)₃) et R'' est un groupe trityl. L'invention concerne également le composé de formule générale I dénommé **12** dans lequel R est un groupe méthyle (-CH₃), R' est le groupe phényle (-C₆H₅) et R'' est un groupe trityl.

C'est également un des objets de la présente invention de fournir un composé de formule générale I dans lequel R est un groupe isopropyle (-CH(CH₃)₂) ; un tel composé de l'invention se caractérise de préférence en ce que R' est sélectionné parmi le groupe méthyle (-CH₃), isopropyle (-CH(CH₃)₂), tertibutyle (-C(CH₃)₃) et phényle (-C₆H₅); un tel composé présente de préférence un groupe R'' sélectionné parmi l'hydrogène (-H), le groupe acétyle (-COCH₃), le groupe isobutyryle (-COCH(CH₃)₂), le groupe pivaloyle (-COC(CH₃)₃), le groupe benzoyle (-CO-C₆H₅). Plus particulièrement l'invention vise à fournir le composé ci-après dénommé :

- **I-203** tel que dans la formule générale I, R est un groupe isopropyle (-CH(CH₃)₂), R' est un groupe méthyle (-CH₃) et R'' est l'hydrogène (-H).

- **I-204** tel que dans la formule générale I, R est un groupe isopropyle ($-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), R' est un groupe méthyle ($-\text{CH}_3$) et R" est le groupe acétyle ($-\text{COCH}_3$).
- **I-205** tel que dans la formule générale I, R est un groupe isopropyle ($-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), R' est un groupe méthyle ($-\text{CH}_3$) et R" est le groupe isobutyryle ($-\text{COCH}(\text{CH}_3)_2$).
- **I-206** tel que dans la formule générale I, R est un groupe isopropyle ($-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), R' est un groupe méthyle ($-\text{CH}_3$) et R" est le groupe pivaloyl ($-\text{COC}(\text{CH}_3)_3$).
- **I-207** tel que dans la formule générale I, R est un groupe isopropyle ($-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), R' est un groupe méthyle ($-\text{CH}_3$) et R" est le groupe benzoyl ($-\text{CO}-\text{C}_6\text{H}_5$).
- **I-208** tel que dans la formule générale I, R est un groupe isopropyle ($-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), R' est un groupe isopropyle ($-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$) et R" est l'hydrogène ($-\text{H}$).
- **I-209** tel que dans la formule générale I, R est un groupe isopropyle ($-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), R' est un groupe isopropyle ($-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$) et R" est le groupe acétyle ($-\text{COCH}_3$).
- **I-210** tel que dans la formule générale I, R est un groupe isopropyle ($-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), R' est un groupe isopropyle ($-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$) et R" est le groupe isobutyryl ($-\text{COCH}(\text{CH}_3)_2$).
- **I-211** tel que dans la formule générale I, R est un groupe isopropyle ($-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), R' est un groupe isopropyle ($-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$) et R" est le groupe benzoyl ($-\text{CO}-\text{C}_6\text{H}_5$).
- **I-214** tel que dans la formule générale I, R est un groupe isopropyle ($-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), R' est un groupe tertiobutyle ($-\text{C}(\text{CH}_3)_3$) et R" est l'hydrogène ($-\text{H}$).
- **I-215** tel que dans la formule générale I, R est un groupe isopropyle ($-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), R' est un groupe tertiobutyle ($-\text{C}(\text{CH}_3)_3$) et R" est le groupe acétyle ($-\text{COCH}_3$).

- **I-216** tel que dans la formule générale I, R est un groupe isopropyle (-CH(CH₃)₂), R' est un groupe tertibutyle (-C(CH₃)₃) et R'' est le groupe isobutyryle (-COCH(CH₃)₂).
 - **I-217** tel que dans la formule générale I, R est un groupe isopropyle
5 (-CH(CH₃)₂), R' est un groupe tertibutyle (-C(CH₃)₃) et R'' est le groupe pivaloyl (-COC(CH₃)₃).
 - **I-218** tel que dans la formule générale I, R est un groupe isopropyle (-CH(CH₃)₂), R' est un groupe tertibutyle (-C(CH₃)₃) et R'' est le groupe benzoyl (-CO-C₆H₅).
 - 10 • **I-219** tel que dans la formule générale I, R est un groupe isopropyle (-CH(CH₃)₂), R' est un groupe phényle (-C₆H₅) et R'' est l'hydrogène (-H).
 - **I-220** tel que dans la formule générale I, R est un groupe isopropyle (-CH(CH₃)₂), R' est un groupe phényle (-C₆H₅) et R'' est le groupe
15 acétyl (-COCH₃).
 - **I-221** tel que dans la formule générale I, R est un groupe isopropyle (-CH(CH₃)₂), R' est un groupe phényle (-C₆H₅) et R'' est le groupe isobutyryl (-COCH(CH₃)₂).
 - **I-222** tel que dans la formule générale I, R est un groupe isopropyle
20 (-CH(CH₃)₂), R' est un groupe phényle (-C₆H₅) et R'' est le groupe pivaloyl (-COC(CH₃)₃).
 - **I-223** tel que dans la formule générale I, R est un groupe isopropyle (-CH(CH₃)₂), R' est un groupe phényle (-C₆H₅) et R'' est le groupe benzoyl (-CO-C₆H₅).
- 25 C'est également un des objets de la présente invention de fournir un composé de formule générale I qui constitue un intermédiaire dans la synthèse du composé I-152, de ses dérivés acylés ou de ses analogues. Ainsi, l'invention concerne également le composé de formule générale I dénommé **14** dans lequel R est un groupe isopropyle (-
- 30 CH(CH₃)₂), R' est le groupe méthyle (-CH₃) et R'' est un groupe trityl. L'invention concerne également le composé de formule générale I dénommé **15** dans lequel R est un groupe isopropyle (-CH(CH₃)₂), R' est

le groupe isopropyle ($-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), et R'' est un groupe trityl. L'invention concerne également le composé de formule générale I dénommé **16** dans lequel R est un groupe isopropyle ($-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), R' est le groupe tertibutyle ($-\text{C}(\text{CH}_3)_3$) et R'' est un groupe trityl. L'invention concerne également le composé de formule générale I dénommé **17** dans lequel R est un groupe isopropyle ($-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), R' est le groupe phényle ($-\text{C}_6\text{H}_5$) et R'' est un groupe trityl.

L'invention concerne également les différents composés de l'invention précédemment évoqués sous la forme thiazolidine. Plus particulièrement, l'invention concerne les composés **I-212** et **I-213** dont la formule chimique est donnée dans le schéma 5 ci-après.

L'invention concerne les composés de formule I sous la forme libre.

La présente invention a également pour objet un procédé de préparation des composés de formule générale (I) selon des procédés analogues à ceux utilisés en synthèse peptidique.

Selon un premier mode de préparation des composés de l'invention, le procédé selon l'invention comprend les étapes suivantes:

- a) protection de la N-acyl-L-cystéine pour fournir le composé N-acyl-S-trityl-L-cystéine;
- b) couplage de la N-acyl-S-trityl-L-cystéine avec le chlorhydrate de S-acylcystéamine pour fournir le composé N-(N-acyl-S-trityl-L-cystéinyl)-S-acylcystéamine.

Toujours selon un premier mode de préparation, les composés de l'invention sous forme thiazolidine peuvent être préparés selon le procédé qui comprend les étapes suivantes :

- a) Protection de la N-acyl-L-cystéine pour fournir le composé N-acyl-S-trityl-L-cystéine ; puis
- b) Couplage de la N-acyl-S-trityl-L-cystéine protégée avec la thiazolidine.

Les composés ainsi obtenus peuvent subir les étapes suivantes de :

c) Déprotection dudit composé obtenu à l'étape b) précédente,
puis

d) Libération du thiol libre de formule (I).

Ainsi, selon un mode préféré de réalisation, le procédé de
5 préparation de composés de l'invention comprend les étapes de :

a) protection de la N-acyl-L-cystéine pour fournir le composé N-
acyl-S-trityl-L-cystéine;

b) couplage de la N-acyl-S-trityl-L-cystéine avec le chlorhydrate
de S-acylcystéamine pour fournir le composé N-(N-acyl-S-
10 trityl-L-cystéinyl)-S-acylcystéamine ;

c) réaction de S-détritylation du composé N-(N-acyl-S-trityl-L-
cystéinyl)-S-acylcystéamine en solution méthanolique et
chloroformique avec un mélange de nitrate d'argent, de
pyridine et de méthanol pour fournir le sulfure d'argent
15 correspondant;

d) mise en suspension dudit sulfure d'argent correspondant
dans du chloroforme puis libération du thiol libre en présence
d'HCl ou d'H₂S.

Plus particulièrement, la préparation du composé I-152 de
20 l'invention peut être réalisée par le procédé précédent ; pour ce faire,
ledit composé N-acyl-S-trityl-L-cystéine de l'étape a) est le N-acétyl-S-
trityl-L-cystéine et ledit chlorhydrate de S-acylcystéamine de l'étape b)
est le chlorhydrate de S-acétylcystéamine.

Une étape supplémentaire de S-acylation peut être adjointe au
25 procédé précédent pour la préparation de composé selon l'invention.

Selon un second mode de réalisation, le procédé selon l'invention,
adapté pour la préparation du composé de formule générale I, dans
laquelle R = R' et R'' est un hydrogène, comprend les étapes suivantes:

a) estérification de la fonction carboxylique de la N-Boc-L-sérine
30 (1) par la N-hydroxysuccinimide dans du N, N-
diméthylformamide (DMF) en présence de 1,3-

dicyclohexylcarbodiimide (DCC) pour former l'ester actif (1');
puis,

b) condensation *in situ* de l'ester actif formé (1') avec
l'éthanolamine (2) pour fournir le composé N-(N-Boc-L-séryl)-2-
aminoéthanol (3); puis,

c) réaction de Mitsunobu sur le composé (3) avec de la
triphénylphosphine et du diisopropyl azodicarboxylate en
présence d'acide thiocarboxylique dans le tétrahydrofuranne
pour fournir le composé N-(N-Boc-S-acyl-L-cystéinyl)-S-
acylcystéamine (4); dans le cadre de la préparation du
composé I-152, l'acide thiocarboxylique est l'acide
thioacétique ; puis,

d) déprotection du composé (4) avec l'acide trifluoroacétique.

Dans un mode particulier de réalisation, l'invention concerne
deux procédés de préparation du composé I-152.

Le premier procédé de préparation du composé I-152 (Schéma 1)
correspond au procédé de préparation du composé de formule générale
(I) décrit précédemment et fait intervenir la L-cystéine correctement
protégée. Ce procédé de préparation se caractérise en ce qu'il comprend
les étapes suivantes (i) de couplage de la N-acétyl-S-trityl-L-cystéine (7)
avec le chlorhydrate de S-acétylcystéamine pour fournir le composé N-
(N-acétyl-S-trityl-L-cystéinyl)-S-acétylcystéamine (8); puis (ii) de réaction
de S-détrytilation du composé N-(N-acétyl-S-trityl-L-cystéinyl)-S-
acétylcystéamine en solution méthanolique et chloroformique avec un
mélange de nitrate d'argent, de pyridine et de méthanol pour fournir le
sulfure d'argent correspondant (9); puis (iii) de mise en suspension
dudit sulfure d'argent correspondant dans du chloroforme; puis (iv) de
libération du thiol libre en présence d'HCl ou d'H₂S.

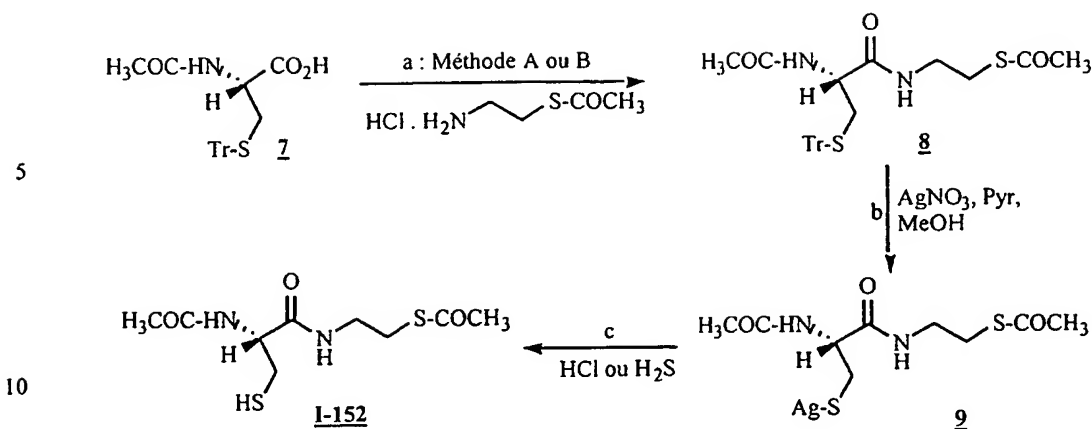


Schéma 1 : Voie 1.

Méthode A: Couplage, via un anhydride mixte formé *in situ*, de la
 15 N-acétyl-S-trityl-L-cystéine (7) avec le chlorhydrate de S-acétylcystéamine; Méthode B: même réaction de couplage, via un ester activé formé *in situ*, de 7. (b) S-détritylation avec formation du sulfure d'argent correspondant. (c) Libération du thiol libre.

- 20
- La méthode A est basée sur la formation, *in situ*, d'un anhydride mixte par réaction de 7 avec le chloroformiate d'isobutyle dans de l'AcOEt, en présence de N-méthylmorpholine (NMM). L'anhydride est ensuite condensé avec la S-acétylcystéamine, libérée de son chlorhydrate par de la NMM, pour fournir 8 avec un rendement
 - 25 après traitements de 55%.
 - La méthode B utilise, *in situ*, l'ester actif N-succinimidyl de 7 qui après condensation avec la S-acétylcystéamine, libérée de son chlorhydrate par de la NMM, permet d'obtenir 8 avec un rendement après traitements de 70%. L'ester actif a été formé par réaction de
 - 30 l'anhydride mixte précédent (Méthode A) avec la N-hydroxysuccinimide dans de l'AcOEt.

Le composé 8, en solution méthanolique et chloroformique, est ensuite S-détritylé par traitement avec un mélange constitué de nitrate d'argent, de pyridine et de méthanol pour fournir le sulfure d'argent

correspondant 9. Ce sulfure, qui peut être isolé, est alors mis en suspension dans du CHCl_3 puis est additionné d' HCl (l'usage d' H_2S conduit au même résultat) pour libérer le thiol libre I-152.

Le second procédé de préparation du composé I-152 (Schéma 2) utilise la L-sérine, N-protégée par un t-butoxycarbonyl (Boc) (1), comme produit de départ.

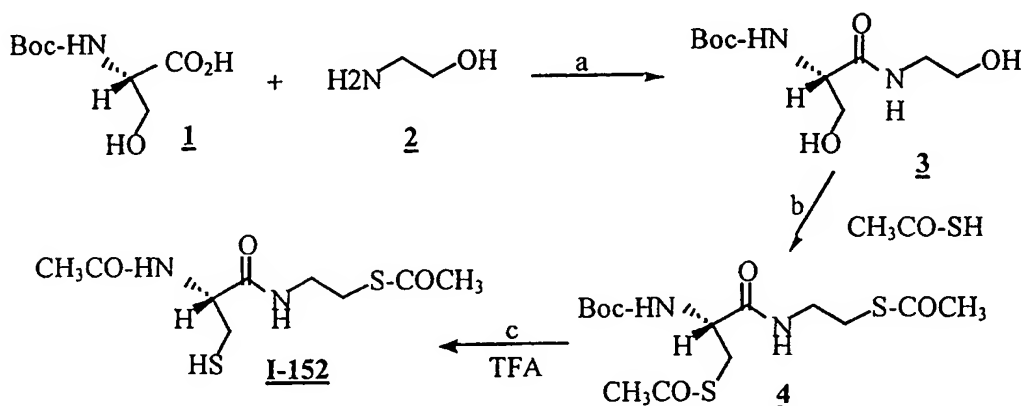


Schéma 2 : Voie 2. (a) Couplage de la N-Boc-L-sérine, via un ester activé formé *in situ*, avec l'éthanolamine. (b) Réaction de Mitsunobu, avec un thioacide, sur les alcools primaires avec passage en série L-cystéine. (c) Déprotection de l'amine et transfert $\text{S} \rightarrow \text{N}$ du groupement acyle.

Ce procédé se caractérise en ce qu'il comprend les étapes suivantes (i) d'activation de la fonction carboxylique de la N-Boc-L-sérine (1) par la N-hydroxysuccinimide dans du DMF en présence de DCC; puis (ii) de condensation *in situ* de l'ester actif formé (1') avec l'éthanolamine (2) pour fournir le composé N-(N-Boc-L-séryl)-2-aminoéthanol (3); puis (iii) de traitement, selon une réaction de Mitsunobu, modifiée par R.P. Volante (*Tetrahedron Lett.* 1981, 22, 3119-3122), du N-(N-Boc-L-séryl)-2-aminoéthanol avec de la triphénylphosphine et du diisopropyl azodicarboxylate en présence d'acide thioacétique dans le tétrahydrofuranne (THF) pour fournir le composé N-(N-Boc-S-acétyl-L-cystéinyl)-S-acétylcystéamine (4). Ainsi, le fait de transformer l'alcool de

la L-sérine en thioester, tout en conservant la configuration du carbone asymétrique, a permis le passage en série L-cystéine; puis (iv) de déprotection du N-(N-Boc-S-acétyl-L-cystéinyl)-S-acétylcystéamine avec du TFA; la déprotection classique du N-Boc de 4 avec le TFA ne permet pas d'isoler l'amine correspondante formée 5, qui est instable dans nos conditions opérationnelles, mais elle permet de synthétiser le composé I-152 par réaction de transfert intramoléculaire S→N du groupement acétyle de 5 via la thiazoline correspondante 6 (Schéma 3). De tels transferts, en particulier sur la S-acétylcystéamine, ont déjà été observés et étudiés (R.E. Barnett *et coll.* ainsi que les références citées, *J. Amer. Chem. Soc.* 1969, 91, 2358-2369). Ces auteurs montrent que le mécanisme de transfert passe, dans certaines conditions de pH, par la formation d'une thiazoline intermédiaire qui ensuite s'hydrolyse pour générer la N-acétylcystéamine. Nous constatons que la formation de la I-152 fait l'objet du même mécanisme puisque nous avons isolé et identifié l'intermédiaire cyclique 6 qui résulte de la N-déprotection de 4 via 5 (Schéma 3).

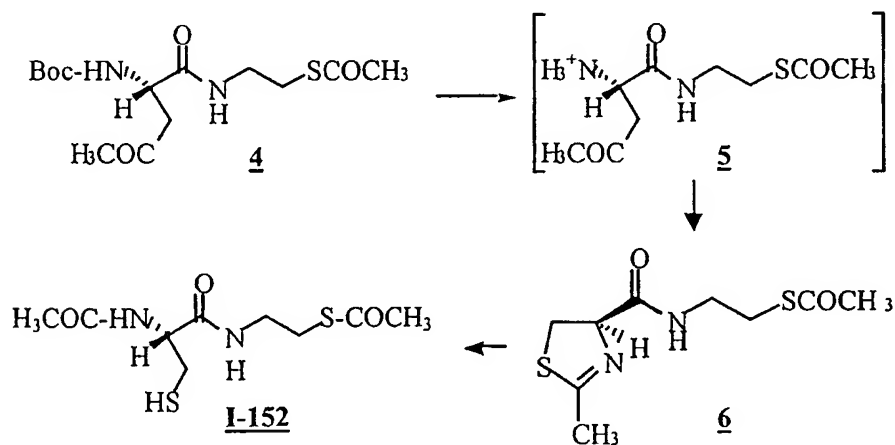


Schéma 3 : Formation de la I-152 par réaction de transfert intramoléculaire S→N du groupement acétyle de 5 via la thiazoline correspondante 6.

La réaction de transfert S→N du S-acyl, sur le résidu cystéine, permet d'obtenir dans les conditions réactionnelles indiquées le composé I-152.

La présente invention concerne également un procédé de
5 préparation du composé de formule générale I, dans laquelle R, R' sont des groupes méthyles (-CH₃) et R'' des groupes acyles; la préparation se fait par S-acylation du composé I-152 en solution dans la pyridine en présence d'un anhydride R₂O ou d'un chlorure d'acide R-Cl caractérisé en ce que R est choisi dans le groupe CO-R¹ dans lequel R¹ est un
10 radical alkyle en C1-C7, linéaire ou ramifié ou un groupe aryle substitué ou non par un ou plusieurs atomes d'halogènes. Ainsi, la préparation du composé I-176 est réalisée par S-acylation du composé I-152, en solution dans la pyridine, avec de l'anhydride acétique. La
préparation du composé I-177 est réalisée par S-acylation du composé
15 I-152, en solution dans la pyridine, avec du chlorure d'isobutyryle. La préparation du composé I-178 est réalisée par S-acylation du composé I-152, en solution dans la pyridine, avec du chlorure de pivaloyle.

Plus généralement, c'est un objet de la présente invention de
fournir un procédé de préparation d'analogues acylés du composé I-152
20 ou de ses dérivés (Schéma 4) en utilisant la méthode B du premier mode de préparation du composé selon l'invention décrit dans le schéma 1 voie 1. Ce procédé comprend les étapes de :

- a) protection de la N-acétyl-L-cystéine ou de la N-isobutyryl-L-cystéine pour fournir respectivement la N-acétyl-S-trityl-L-cystéine (7) et la N-isobutyryl-S-trityl-L-cystéine (13) ;
25
- b) différents couplages de (7) ou de (13) avec des chlorhydrates de S-acyl-cystéamines pour fournir différents pseudopeptides correspondants. Parmi ceux-ci il convient de citer les composés 10, 11, 12 obtenus à partir de 7, et les composés 14, 15, 16,
30 17 obtenus à partir de 13.

Alternativement, ce procédé de préparation d'analogues du composé I-152 peut être poursuivi par une étape :

c) de réaction de S-détritrylation telle que précédemment décrite lors de la préparation de I-152.

Ainsi, les réactions de S-détritrylation des composés 10, 11, 12 sont réalisées pour donner les composés thiols correspondants I-188, I-193, 5 I-198. Ces composés peuvent subir une étape :

d) de S-acylation pour fournir les composés précédemment décrits I-189, I-190, I-191, I-192, I-194, I-195, I-196, I-197, I-199, I-200, I-201, I-202.

Ainsi, la réaction de S-acylation de I-188 permet d'obtenir les 10 composés I-189, I-190, I-191, I-192. Plus particulièrement, la réaction de S-acétylation de I-188 fournit I-189, la réaction de S-isobutyrylation de I-188 fournit I-190, la réaction de S-pivaloylation de I-188 fournit I-191, la réaction de S-benzoylation de I-188 fournit I-192.

Ainsi, la réaction de S-acylation de I-193 permet d'obtenir les 15 composés I-194, I-195, I-196, I-197. Plus particulièrement, la réaction de S-acétylation de I-193 fournit I-194, la réaction de S-isobutyrylation de I-193 fournit I-195, la réaction de S-pivaloylation de I-193 fournit I-196, la réaction de S-benzoylation de I-193 fournit I-197.

Ainsi, la réaction de S-acylation de I-198 permet d'obtenir les 20 composés I-199, I-200, I-201, I-202. Plus particulièrement, la réaction de S-acétylation de I-198 fournit I-199, la réaction de S-isobutyrylation de I-198 fournit I-200, la réaction de S-pivaloylation de I-198 fournit I-201, la réaction de S-benzoylation de I-198 fournit I-202.

Ainsi, les réactions de S-détritrylation des composés 14, 15, 16, 17 25 sont réalisées pour donner les composés thiols correspondants I-203, I-208, I-214, I-219. Ces composés peuvent subir une étape :

d) de S-acylation pour fournir les composés précédemment décrits I-204, I-205, I-206, I-207, I-209, I-210, I-211, I-215, I-216, I-217, I-218

30 Ainsi, la réaction de S-acylation de I-203 permet d'obtenir les composés I-204, I-205, I-206, I-207. Plus particulièrement, la réaction de S-acétylation de I-203 fournit I-204, la réaction de S-isobutyrylation

de I-203 fournit I-205, la réaction de S-pivaloylation de 203 fournit I-206, la réaction de S-benzoylation de I-203 fournit I-207.

Ainsi, la réaction de S-acylation de I-208 permet d'obtenir les composés I-209, I-210, I-211. Plus particulièrement, la réaction de S-
5 acétylation de I-208 fournit I-209, la réaction de S-isobutyrylation de I-208 fournit I-210, la réaction de S-benzoylation de I-208 fournit I-211.

Ainsi, la réaction de S-acylation de I-214 permet d'obtenir les composés I-215, I-216, I-217, I-218. Plus particulièrement, la réaction de S-acétylation de I-214 fournit I-215, la réaction de S-isobutyrylation
10 de I-214 fournit I-216, la réaction de S-pivaloylation de I-214 fournit I-217, la réaction de S-benzoylation de I-214 fournit I-218.

Ainsi, la réaction de S-acylation de I-219 permet d'obtenir les composés I-220, I-221, I-222, I-223. Plus particulièrement, la réaction de S-acétylation de I-219 fournit I-220, la réaction de S-isobutyrylation
15 de I-219 fournit I-221, la réaction de S-pivaloylation de I-219 fournit I-222, la réaction de S-benzoylation de I-219 fournit I-223.

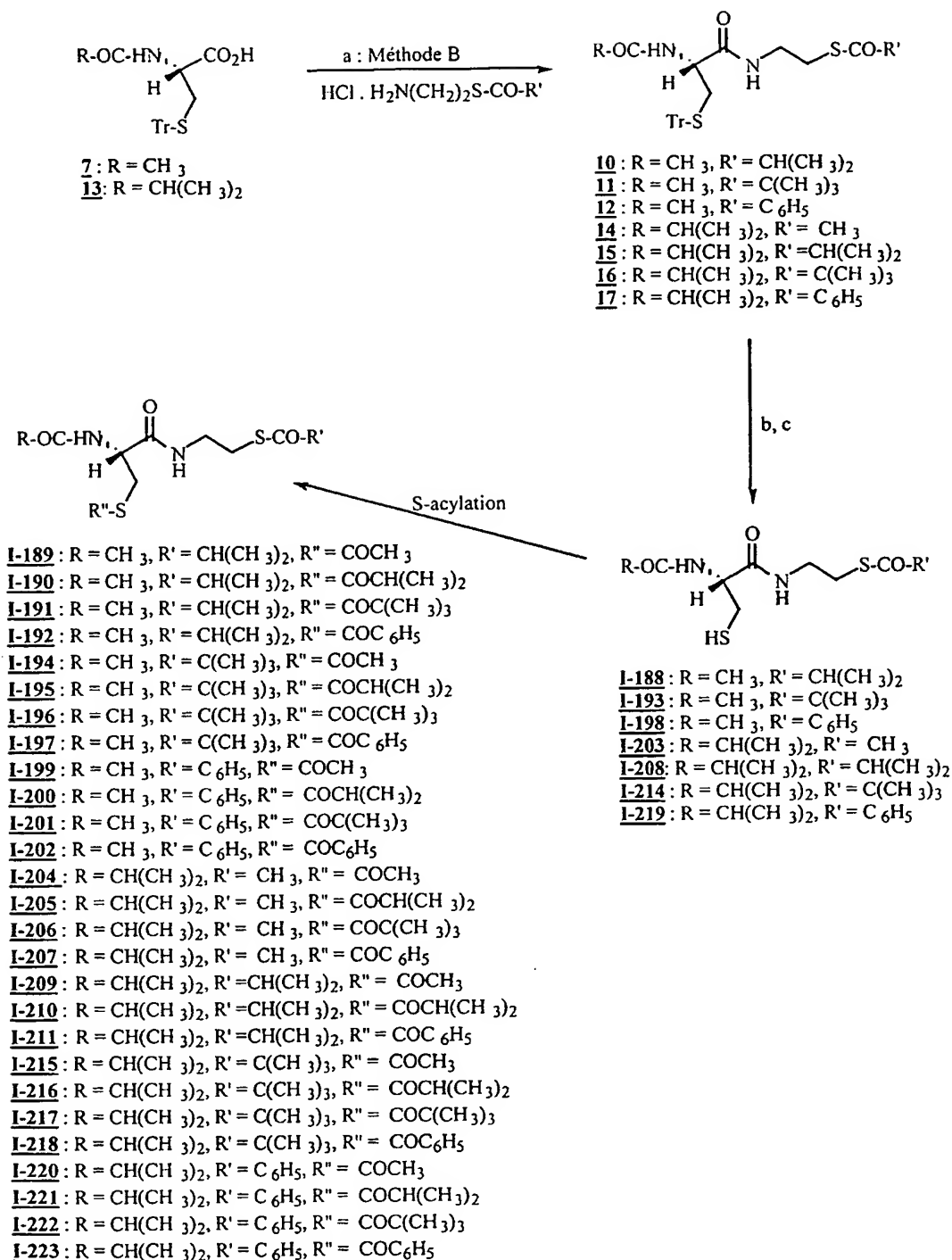


Schéma 4 : Obtention d'analogues acylés de la I-152 ou de ses dérivés en utilisant la méthode B décrite dans le schéma 1-voie1.

Concernant les composés de l'invention sous forme thiazolidine, ceux-ci sont de préférence obtenus par couplage de N-acyl-S-trityl-L-

cystéine avec la thiazolidine selon la méthode A décrite dans le schéma 1 voie 1. L'invention concerne plus particulièrement, les composés I-212 et I-213 qui sont susceptibles d'être obtenus par le procédé décrit au schéma 5. Dans ce cas, la N-acétyl-S-trityl-L-cystéine (7) a été couplée
 5 selon la méthode A, schéma 1 : voie 1) avec la thiazolidine pour former le composé 18. La S-détritylation de ce dernier, selon le protocole précédemment décrit, notamment pour l'obtention de I-152, permet de générer un thiol libre dénommé I-212. La préparation du composé I-213 est réalisée par S-acétylation de la I-212. Les trois produits de couplage
 10 (18, I-212 et I-213) ont été respectivement isolés sous forme d'un mélange de deux isomères conformationnels. Ces isomères sont dus à la présence du carbonyl, de la liaison pseudopeptidique en alpha de l'atome d'azote de la thiazolidine.

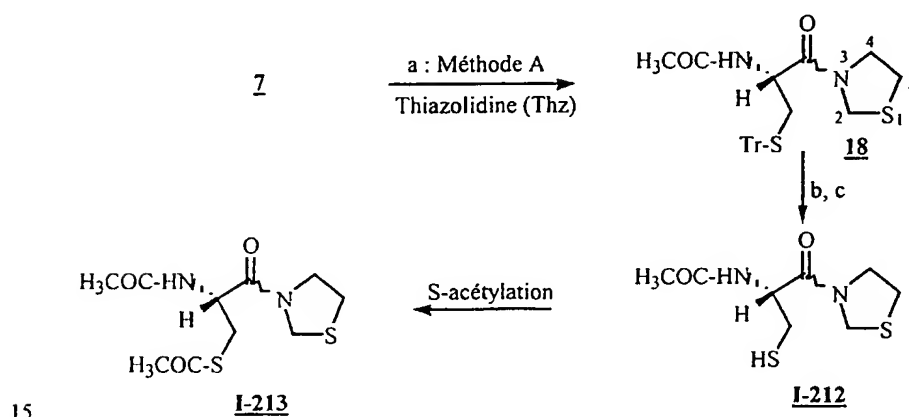


Schéma 5 : Obtention de la N-(N-NAC)-Thiazolidine et de son dérivé acétylé via la méthode A décrite dans le schéma 1-voie 1.

20 Tous les composés de l'invention présentent une caractéristique commune; il s'agit de précurseurs de composés intervenant dans la voie de biosynthèse du glutathion. En d'autres termes, ces composés peuvent être utilisés comme des intermédiaires intervenant dans la voie de biosynthèse du glutathion. Il peut s'agir par exemple d'un produit
 25 choisi dans le groupe formé par la NAC, la MEA, la L-cystéine.

Les composés de l'invention présentent une activité antioxydante. L'invention a donc également pour objet l'utilisation des composés tels que décrits ci-dessus comme agents antioxydants; de tels composés possèdent une large panoplie d'utilisations telles que l'utilisation dans
5 le traitement préventif et curatif de syndromes pathologiques pour lesquels sont observés un stress oxydatif et un déficit en GSH, les utilisations en cosmétologie ou les utilisations dans l'industrie agroalimentaire.

L'invention vise à fournir des agents antioxydants pour lutter
10 contre le stress oxydatif et pour augmenter le taux intracellulaire de glutathion. Les composés de la présente invention peuvent être utilisés, à titre de médicament, en particulier pour augmenter le taux intracellulaire et/ou extracellulaire de glutathion. L'invention couvre également l'utilisation d'un composé selon l'invention pour la
15 préparation d'un médicament destiné à augmenter le taux intracellulaire et/ou extracellulaire de glutathion. La présente invention concerne également une composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle comprend une quantité efficace d'un composé selon l'invention et un véhicule pharmaceutiquement acceptable. L'invention
20 porte également sur l'utilisation d'un composé selon l'invention pour la préparation d'un médicament ou d'une composition pharmaceutique pour le traitement et/ou la prévention de pathologies ou de troubles liés à une déplétion en glutathion intra et/ou extracellulaire.

Les pathologies qui peuvent faire l'objet d'une prophylaxie ou d'un
25 traitement par les composés de l'invention sont notamment les infections virales, les infections bactériennes, les infections parasitaires, les maladies du tractus respiratoire, les maladies neurodégénératives, les maladies auto-immunes, les maladies cardio-vasculaires, les cancers, les maladies du système immunitaire, le diabète, et de
30 préférence le diabète de type I, les pathologies ophtalmiques, les maladies dermatologiques.

L'invention porte plus particulièrement sur l'utilisation d'un composé tel que décrit précédemment pour la préparation d'un médicament ou d'une composition pharmaceutique pour le traitement et/ou la prévention des infections virales; il s'agit en particulier des infections virales causées par les virus à ADN et les virus à ARN, et plus particulièrement par les virus rétroïdes, plus particulièrement le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) et de manière préférée le virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1). L'infection par le VIH est responsable du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) qui constitue une pathologie humaine pour laquelle les oxydants jouent un rôle important. Le SIDA constitue un problème de santé publique pour beaucoup de pays dans le monde depuis 1981, date à laquelle la maladie a été pour la première fois identifiée. Lorsque le SIDA est déclaré, la mort survient généralement deux à trois ans après le diagnostic suite à un effondrement des défenses immunitaires du patient et à de multiples infections opportunistes. Au cours de l'infection par le VIH, une diminution des taux cellulaires et plasmatiques des molécules antioxydantes est observée. Ce dérèglement immunitaire baptisé « stress oxydatif » est critique pour le malade. Il semble jouer un rôle majeur dans la physiopathologie des infections par le VIH en augmentant la réplication virale, le syndrome inflammatoire, l'apoptose, la perte de poids des patients (cachexie), et les intoxications médicamenteuses. Si les mécanismes contribuant à ce stress oxydatif sont mal connus, il semble probable que le syndrome inflammatoire chronique associé aux infections à VIH, l'amplifie. De même, le VIH via la protéine Tat semble lui-même jouer un rôle majeur. En effet, cette protéine bloque la production et la sécrétion de la superoxyde dismutase à manganèse (MnSOD), une enzyme susceptible de prévenir le stress oxydatif, et diminue fortement l'activité de la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD), une enzyme nécessaire au maintien du glutathion sous sa forme réduite.

Chez les individus infectées par le VIH, les thiols et tout particulièrement le GSH sont diminués dans le plasma, et les cellules mononucléées du sang périphérique (CMSP). Les atteintes sont aussi bien sanguines que tissulaires puisque le déficit en GSH est retrouvé
5 dans les lavages broncho-alvéolaires et dans le système nerveux central (SNC). Ces doubles localisations d'une part confirment que les deux cibles majeures du VIH, les lymphocytes et les macrophages sont touchés, et d'autre part illustrent l'ampleur du déficit. Ceci peut probablement expliquer, tout du moins pour une part, les résultats
10 publiés par L.A. Herzenberg et coll. (*Proc. Natl. Acad. Sci.* 1997, 94, 1967-1972). Ces auteurs montrent l'existence d'un lien direct entre la survie des malades et le taux de GSH.

La thérapeutique antirétrovirale actuelle repose sur deux familles de molécules, les inhibiteurs de la transcriptase inverse (TI), (AZT, ddI, névirapine, etc...) et les inhibiteurs de la protéase virale (indinavir, saquinavir, etc...). Elles sont dotées d'une certaine activité *in vivo* lorsqu'elles sont associées entre elles. Toutefois, ces molécules sont incapables de réorganiser pleinement les atteintes tissulaires telles par exemple les syndromes inflammatoire et oxydatif dans le SNC et ont
20 une efficacité réduite ou nulle vis-à-vis des pathologies associées à l'infection par le VIH. Compte-tenu du rôle majeur du GSH dans le contrôle de ces deux syndromes et de sa pluralité d'effets dans la physiopathologie des infections à VIH, de nombreuses alternatives visant à remonter son taux intracellulaire ont été envisagées sans
25 succès comme stratégie thérapeutique adjuvante au cours des dernières années.

L'expansion continue des infections par le virus VIH et des infections opportunistes associées rend nécessaire de disposer d'un traitement efficace contre le SIDA et les atteintes tissulaires associées.
30 L'un des buts de la présente invention est donc d'utiliser les composés répondant à la formule générale (I), de préférence les composés I-152 et/ou I-176 et/ou I-177 et/ou I-178, pour la préparation d'un

médicament ou d'une composition pharmaceutique pour le traitement et/ou la prévention des infections virales provoquées par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) et plus particulièrement le virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1). La présente invention
5 fournit également une composition pharmaceutique, pour le traitement préventif et curatif du SIDA et des atteintes tissulaires associées, caractérisée en ce qu'elle contient une quantité thérapeutiquement efficace d'un composé selon l'invention et un véhicule pharmaceutiquement acceptable. La présente invention porte également
10 sur un produit comprenant au moins un composé selon l'invention et au moins un inhibiteur de la transcriptase inverse et/ou comme produit de combinaison pour une utilisation simultanée, séparée ou étalée dans le temps en thérapie antivirale. L'inhibiteur de la transcriptase inverse est choisi par exemple parmi le 3'-azido-3'désoxythymidine (AZT), le
15 2',3'-didésoxyinosine (ddI), le 2',3'-didésoxycytidine (ddC), le (-)-2',3'-didésoxy-3'-thiacytidine (3TC), le 2',3'-didéshydro-2',3'-didésoxy-thymidine (d4T) et le (-)-2'-désoxy-5-fluoro-3'-thiacytidine (FTC), le TIBO, le HEPT, le TSAO, l' α -APA, la névirapine, le BAHP, l'acide phosphonoformique (PFA). L'inhibiteur de la protéase virale est choisi
20 plus particulièrement parmi l'indinavir et le saquinavir.

Il est également dans l'étendue de l'invention d'utiliser les composés répondant à la formule générale (I), de préférence les composés I-152 et/ou I-176 et/ou I-177 et/ou I-178, pour la
25 préparation d'un médicament ou d'une composition pharmaceutique pour le traitement et/ou la prévention de maladies cardio-vasculaires choisies de préférence parmi le groupe composé de l'hypertension artérielle, de l'artériosclérose, des ischémies cérébrales, des ischémies cardiaques, des arythmies ventriculaires, des fibrillations ventriculaires, de l'infarctus du myocarde. En effet, les patients atteints d'hypertension
30 artérielle traités avec des nitrates organiques développent fréquemment des résistances aux effets de ces drogues. Il a été suggéré que cette tolérance est associée entre autres facteurs à la déplétion en groupes

thiols dans les muscles lisses vasculaires. Il a été démontré que des précurseurs métaboliques du glutathion tels la NAC préviennent le développement de la tolérance ou au moins restaurent les effets des nitrates organiques (Abrams 1991, Horowitz 1991, Bosegaard *et al.* 5 1993). La présente invention se propose donc de fournir de nouveaux composés pour prévenir le développement de la tolérance ou au moins restaurer les effets des nitrates organiques utilisés dans le traitement de l'hypertension artérielle. Heller *et al.* (1997) ont expérimentalement démontré l'action de différentes espèces réactives de l'oxygène dans 10 l'inflammation des îlots de Langerhans et dans la destruction des cellules β . La présente invention a donc pour objet de fournir de nouveaux composés pour le traitement et la prévention du diabète de type I (IDDM) (Rabinovitch *et al.*, 1992).

Le stress oxydatif et le déficit en GSH interviennent également 15 dans d'autres pathologies. Ainsi, dans le domaine de l'ophtalmologie, ils sont à relier avec l'apparition de la cataracte. Il est donc dans l'étendue de l'invention d'utiliser les composés répondant à la formule générale (I), de préférence les composés I-152 et/ou I-176 et/ou I-177 et/ou I-178, pour la préparation d'un médicament ou d'une composition 20 pharmaceutique pour le traitement et/ou la prévention de pathologies ophtalmiques telles que les atteintes oculaires du syndrome de Sjogren et la cataracte.

Il est également dans l'étendue de l'invention d'utiliser les composés répondant à la formule générale (I), de préférence les 25 composés I-152 et/ou I-176 et/ou I-177 et/ou I-178, pour la préparation d'un médicament ou d'une composition pharmaceutique pour le traitement et/ou la prévention des maladies du tractus respiratoire, notamment l'emphysème pulmonaire, la fibrose pulmonaire idiopathique, la mucoviscidose, la bronchite chronique, la 30 bronchite aiguë, le syndrome de détresse respiratoire de l'adulte.

L'invention porte également sur l'utilisation d'un composé tel que décrit précédemment pour la préparation de médicaments destinés au traitement préventif et/ou curatif des pertes auditives liées au bruit.

L'invention porte également sur l'utilisation d'un composé tel que
5 décrit précédemment pour la préparation de médicaments destinés au traitement des empoisonnements liés à l'administration par voie orale ou parentérale, en surdose ou non, de substances choisies de préférence parmi le groupe composé de l'acétaminophène, les nitrites, l'éthanol, l'acrylonitrile, les métaux lourds et plus particulièrement l'or,
10 l'argent, le mercure.

Les propriétés antioxydantes du composé de l'invention recommandent son utilisation dans le domaine de la cosmétique. En effet, les antioxydants sont déjà utilisés en cosmétologie pour ralentir le vieillissement. Les composés de la présente invention sont capables de
15 promouvoir la reconstruction du contenu cellulaire de GSH et de fournir une protection efficace contre les dommages cellulaires causés par des facteurs toxiques extrinsèques et intrinsèques; la peau est le lieu d'agression de ces facteurs. Les facteurs extrinsèques incluent par exemple les radiations ultraviolettes, le vent, la faible humidité, les
20 abrasifs et les agents tensioactifs forts. Les facteurs intrinsèques incluent le vieillissement chronologique et les modifications biochimiques de la peau. Qu'ils soient extrinsèques ou intrinsèques, ces facteurs provoquent l'apparition de rides et d'autres changements histologiques associés au vieillissement de la peau. Les agents anti-
25 rides connus à l'heure actuelle incluent des composés tels la N-acétyl-L-cystéine, les rétinoïdes tels que l'acide rétinoïque et les acides alpha-hydroxy tels que l'acide glycolique et l'acide lactique. C'est donc l'un des objets de l'invention d'utiliser les propriétés antioxydantes des composés selon l'invention pour (i) prévenir, effacer et traiter les rides,
30 les ridules de la peau; et/ou (ii) lutter contre le relâchement cutané et/ou sous cutané; et/ou (iii) améliorer la texture de la peau et raviver l'éclat de la peau; et/ou (iv) éliminer les poils indésirés de la peau; et/ou

(v) diminuer les tailles des pores de la peau; et/ou (vi) déformer en permanence les cheveux. Concernant ce dernier point, il convient de noter que des molécules organiques porteuses de groupes fonctionnels thiols tels les composés selon l'invention sont des produits ayant de multiples applications. Une de ces applications est la déformation (frisage et défrisage) permanente des cheveux, qui consiste, dans un premier temps, à réaliser l'ouverture des liaisons disulfures (S-S) des unités cystine de la kératine à l'aide d'une composition contenant au moins un composé organique porteur de groupe fonctionnel thiol agissant comme réducteur (étape de réduction) ce qui permet de conférer aux cheveux la forme que l'on souhaite; puis après avoir rincé la chevelure, à reconstituer, dans un second temps, lesdites liaisons disulfures en appliquant, sur les cheveux une composition oxydante (étape d'oxydation, dite aussi de fixation), de façon à fixer les cheveux dans la forme qui leur a été donnée. L'invention concerne donc une composition cosmétique pour le traitement de la peau et/ou des cheveux et/ou des poils caractérisée en ce qu'elle contient un composé selon l'invention et un excipient cosmétiquement acceptable. L'invention porte également sur un procédé de traitement cosmétique de la peau pour prévenir, effacer et traiter les rides, les ridules de la peau et/ou lutter contre le relâchement cutané et/ou sous-cutané et/ou améliorer la texture de la peau et raviver l'éclat de la peau et/ou éliminer les poils indésirés de la peau et/ou diminuer les tailles des pores de la peau comprenant l'application sur la peau d'une composition cosmétique telle que précédemment décrite.

Les propriétés antioxydantes du composé de l'invention recommandent son utilisation dans le domaine agroalimentaire. Il est donc dans la portée de cette invention d'utiliser les composés de l'invention en tant qu'agents antioxydants pour la conservation des propriétés organoleptiques et nutritionnelles des boissons notamment les jus de fruits, et les aliments.

D'autres caractéristiques et avantages de la présente invention seront mieux mis en évidence à la lecture des exemples suivants ; dans ces exemples on se référera aux figures suivantes :

Figure 1 : décomposition probable de la I-152.

- 5 **Figure 2** : comparaison des activités antivirales de la NAC, de la MEA et de la I-152 dans des cultures de MDM infectés par 10 000 TCID₅₀ de l'isolat VIH-1/Ba-L : effet-doses. Les résultats sont exprimés selon la moyenne \pm écart-type des pourcentages d'inhibition. La réplication virale a été mesurée par le dosage de l'activité transcriptase inverse
- 10 dans les surnageants de culture.

Figure 3 : cytotoxicité de la NAC, MEA et I-152 vis-à-vis des MDM.

Figure 4 : mesure de l'activité TI et de la production de la protéine p25 dans les surnageants de culture de MDM infectés par la souche VIH-1/Ba-L, et traités par la I-152.

- 15 **Figure 5** : effet de la m.o.i. sur l'activité antivirale de la I-152. Les MDM ont été infectés par 1 000 ou 10 000 TCID₅₀ de l'isolat VIH-1/Ba-L.

Figure 6 : Effets de la I-152 sur la réplication virale selon le mode de traitement : pré-traitement 24 heures, traitement 24 heures après l'infection, traitement 7 jours après l'infection.

- 20 **Figure 7** : activité antivirale de la I-152 dans les CMSP quiescentes ou activées par la PHA-P, et infectées par la souche VIH-1-LAI.

Figure 8 : activité antivirale de la I-152 dans des LSP quiescents ou activés par la PHA-P, puis infectés par la souche VIH-1-LAI.

- Figure 9** : effets de la I-152 sur l'intégration du provirus au sein du
- 25 génome cellulaire.

Figure 10 : effets de la I-152 sur l'activité enzymatique de la TI du VIH-1. Les expériences ont été réalisées en triplicat.

Figure 11 : dosage du glutathion total intracellulaire dans les CMSP quiescentes, traitées 24 heures avant par la NAC, la MEA ou la I-152.

- 30 **Figure 12** : activité antivirale des dérivés de la I-152 (la I-176 est cytotoxique à la dose testée).

Figure 13 : Concentration intracellulaire de GSH dans les MDM infectés ou non *in vitro* par la souche de référence à tropisme macrophagique VIH-1/Ba-L, et traités ou non par le composé I-152.

Figure 14 : Effets du composé I-152 sur la concentration intracellulaire de GSH et la synthèse de TNF- α dans les MDM stimulés *in vitro* par un lipopolysacchride bactérien (LPS; 1 μ g/mL) et l'IFN- γ (100 UI/mL).

Figure 15 : Concentration intracellulaire de GSH dans les macrophages spléniques après traitement ou non par I-152. La concentration intracellulaire de GSH dans les macrophages spléniques humains non-traités est de 22 ± 2 μ M.

Figure 16 : Concentration intracellulaire de GSH dans les macrophages spléniques infectés ou non *in vitro* par la souche de référence à tropisme macrophagique VIH-1/Ba-L.

Figure 17 : Effets de I-152 sur l'activité anti-VIH de l'AZT dans les MDM infectés par la souche VIH-1/Ba-L.

Tableau I : Comparaison des activités antivirales de la NAC, de la MEA et de la I-152 dans des cultures de MDM infectés par 10 000 TCID₅₀ de l'isolat VIH-1/Ba-L : doses effectrices 50, 70 et 90%.

Tableau II : Effets de la m.o.i. sur l'activité antivirale de la I-152 : doses effectrices 50%.

Tableau III : Activité antivirale de la I-152 dans les MDM spléniques infectés par 10 000 TCID₅₀ de l'isolat VIH-1/Ba-L : doses effectrices 50, 70 et 90%.

Tableau IV : Comparaison des activités antivirales de la I-152 et de ses analogues S-acylés dans des cultures de MDM infectés par 10 000 TCID₅₀ de l'isolat VIH-1/Ba-L : doses effectrices 50, 70 et 90%.

Tableau V : Comparaison des activités antivirales de la I-152 et de ses dérivés (N-isobutyryl) diversement S-acylés dans des cultures de MDM infectés par 10 000 TCID₅₀ de l'isolat VIH-1/Ba-L : doses effectrices 50, 70 et 90%.

EXEMPLE 1: SYNTHÈSE DE LA N-(N-ACÉTYL-L-CYSTEINYL)-S-ACÉTYLCYSTEAMINE (I-152)

**1.1. Première voie de synthèse de la I-152 utilisant la L-cystéine S,
5 N protégée :**

1.1.1. N-(N-ACÉTYL-S-TRITYL-L-CYSTEINYL)-S-ACÉTYLCYSTEAMINE (8)

a)- Méthode de couplage faisant intervenir *in situ* un anhydride mixte

10 Une solution contenant 290 mg (0,71 mmole) de N-acétyl-S-trityl-L-cystéine (**7**, Bachem) et 80 μ L (0,72 mmole) de N-méthylmorpholine (NMM) dans 5 ml d'AcOEt est agitée à -15°C puis additionnée de 93 μ L (0,71 mmole) de chloroformiate d'isobutyle. Après 15 min d'agitation et en maintenant la température initiale, on ajoute 111,4 mg (0,71 mmole)
15 de chlorhydrate de S-acétylcystéamine (préparé selon T. Wieland et E. Bokelman, *Ann. Chem.*, 1952, 576, 20-34) puis 80 μ L (0,72 mmole) de NMM. Le mélange réactionnel est maintenu 15 min à -15°C puis, après retour à la température ambiante, on poursuit l'agitation durant 3 h. Le chlorhydrate de NMM formé est filtré et lavé avec 2 x 2,5 ml d'AcOEt et
20 les phases organiques rassemblées sont évaporées à sec sous vide. Le produit de couplage est ensuite isolé de la gomme obtenue par « flash » chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : AcOEt/éther de pétrole 30%). On recueille 198 mg (Rdt = 55%) du composé attendu. R_f (AcOEt/éther de pétrole, 9 : 1) : 0,41. Cristallise dans un mélange d'
25 AcOEt/éther de pétrole sous forme d'une poudre incolore. F = 111-113°C. $[\alpha]_D^{20} = +10,5^\circ$ (c 0,8; CHCl₃).

RMN ¹H (CDCl₃) δ ppm : 1,90 (s, 3H, NCOCH₃); 2,29 (s, 3H, SCOCH₃); 2,48 (dd, J = 5,7; 12,9 Hz, 1H, β Ha cys); 2,82 (dd, J = 6,4; 12,9 Hz, 1H, β Hb cys); 2,92-3,01 (m, 2H, NCH₂CH₂S); 3,32-3,42 (m, 2H, NCH₂CH₂S);
30 4,07-4,20 (m, 1H, α H cys); 5,70 (d, J = 7,6 Hz, 1H, NH cys); 6,34 (t, J = 5,5 Hz, 1H, NHCH₂); 7,19-7,35 et 7,40-7,47 (2m, 15H, H aromatiques).

SM : (FAB⁺/NBA+K⁺) m/z 545 (M+K)⁺, 507 (M+H)⁺; (FAB⁻/NBA) m/z 505 (M-H)⁻.

Analyse : C₂₈H₃₀N₂O₃S₂ (506)

Calc. % : C 66,40 H 5,93 N 5,53

5 Tr. % : 66,17 6,00 5,81

b)- Méthode de couplage faisant intervenir *in situ* un ester activé

Une solution contenant 1,5 g (3,70 mmoles) de **7** et 410 μ L (3,73 mmoles) de NMM dans 30 ml d'AcOEt est agitée à -15°C puis
10 additionnée de 480 μ l (3,70 mmoles) de chloroformiate d'isobutyle. Après 15 min d'agitation et en maintenant la température initiale, on ajoute 426 mg (3,70 mmoles) de N-hydroxysuccinimide. Le mélange réactionnel est maintenu 15 min à -15°C puis, après retour à la température ambiante, on poursuit l'agitation durant 2 h. Le
15 chlorhydrate de NMM formé est filtré et lavé avec 2 x 5 ml d'AcOEt. Les phases organiques contenant l'ester actif O-N-succinimide de **7** sont rassemblées et agitées à -15°C. La solution est alors additionnée successivement de 575 mg (3,70 mmoles) de chlorhydrate de S-acétylcystéamine et de 410 μ L (3,73 mmoles) de NMM. Le mélange réactionnel
20 est maintenu 15 min à -15°C puis, après retour à la température ambiante, on poursuit l'agitation durant 12 h. La solution est ensuite diluée avec 300 ml d'AcOEt, lavée (eau, 30 ml; bicarbonate de sodium saturé et glacé, 30 ml; eau, 30 ml; acide citrique 0,1N glacé, 30 ml; eau, 3 x 30 ml), séchée sur sulfate de sodium, filtrée et évaporée à sec sous
25 vide. Le résidu obtenu est ensuite purifié comme ci-dessus pour donner, avec un rendement de 70% (1,31 g) et avec rigoureusement les mêmes critères physico-chimiques, le produit de couplage **8** précédemment décrit.

1.1.2. N-(N-ACETYL-L-CYSTEINYL)-S-ACETYLCYSTEAMINE (I-152)

Une solution, saturée et protégée de la lumière, de 1,26 g (2,49 mmoles) de **8** dans 20 ml de MeOH et 1,5 ml de CHCl₃ est agitée à la
5 température ambiante et additionnée d'un mélange, également protégé de la lumière, contenant 449 mg (2,64 mmoles) de nitrate d'argent et 213 µl (2,64 mmoles) de pyridine dans 13 ml de MeOH. Instantanément, il y a formation d'un précipité du sulfure d'argent correspondant **9**. A la fin de l'ajout, l'agitation est arrêtée et le mélange réactionnel est
10 abandonné une nuit à la température ambiante. Le précipité est ensuite filtré et lavé avec du MeOH (2 x 10 ml) puis avec du CHCl₃ (2 x 10 ml).

Un échantillon analytique de **9** est prélevé puis séché sous vide à l'abri de la lumière.

Analyse : C₉H₁₅N₂O₃S₂Ag (371)

15 Calc. % : Ag 29,11

Tr. % : 29,16

Le sulfure précédent **9** est mis en suspension dans 15 ml de CHCl₃ et agité à la température ambiante et à l'abri de la lumière, puis additionné de 400 µl d'acide chlorhydrique concentré. L'agitation est
20 poursuivie 2 h à la température ambiante puis 2 min à 30-35 °C. Le mélange est alors dilué avec 70 ml de CHCl₃ et le chlorure d'argent formé est filtré puis lavé avec 3 x 10 ml du même solvant. Les phases organiques sont rassemblées, lavées rapidement à l'eau glacée (3 x 10 ml), séchées sur sulfate de sodium, filtrées et évaporées à sec sous vide.
25 On recueille une pâte semi-cristalline qui cristallise dans un mélange d'AcOEt/éther de pétrole sous forme de microcristaux incolores (368 mg, Rdt = 56%). F = 121-122°C. [α]_D²⁰ = -39,1° (c 0,9; CHCl₃). Les autres données (microanalyses et spectres) sont en tous points identiques à celles décrites dans la deuxième voie de synthèse.
30 L'H₂S a aussi été utilisé et conduit au même résultat.

1.2. Deuxième voie de synthèse de la I-152 utilisant la L-sérine N-protégée:

1.2.1. N-(N-Boc-L-SERYL)-2-AMINOETHANOL (3)

5

Une solution contenant 6,15 g (30 mmoles) de N-Boc-L-sérine (**1**, Fluka) et 3,45 g de N-hydroxysuccinimide (30 mmoles) dans 80 ml de DMF est agitée à 0 °C et additionnée de 6,2 g (30 mmoles) de DCC. Le mélange réactionnel est maintenu 15 min à 0 °C puis on le laisse
10 revenir à la température ambiante et on poursuit l'agitation durant 1 h 30. On ajoute ensuite 2,75 ml (60 mmoles) d'éthanolamine. Après 12 h d'agitation, la DCU formée est filtrée et lavée avec 2 x 15 ml de DMF. Les phases organiques rassemblées sont évaporées à sec sous vide. Le produit est isolé de la pâte résiduelle par « flash » chromatographie sur
15 colonne de gel de silice (Kieselgel Merck 60, 230-400 mesh; éluant : CH₂Cl₂/MeOH 6%,). On recueille le composé attendu sous forme d'une gomme qui cristallise dans un mélange d'AcOEt/hexane pour fournir 5,21 g (Rdt = 70%) d'aiguilles incolores. R_f (CH₂Cl₂/MeOH, 9,3 : 0,7) : 0,23; (CH₂Cl₂/MeOH/AcOH, 9 : 0,9 : 0,1) : 0,47. F = 74-76°C. [α]_D²⁰ = -
20 2,2° (c 0,9; CHCl₃).
RMN ¹H (DMSO-*d*₆) δ ppm : 1,50 (s, 9H, *H* *t*-butyl); 3,18-3,29 (m, 2H, NCH₂CH₂O); 3,45-3,55 (m, 2H, NCH₂CH₂O); 3,57-3,70 (m, 2H, β CH₂ ser); 4,01-4,10 (m, 1H, α *H* ser); 4,77 (t, J = 5,4 Hz, 1H, OH ser); 4,91 (t, J = 5,7 Hz, 1H, NCH₂CH₂OH); 6,71 (d, J = 8,2 Hz, 1H, NH ser); 7,86 (t, J
25 = 5,5 Hz, 1H, NHCH₂).
SM : (FAB⁺/G-T) *m/z* 745 (3M+H)⁺, 497 (2M+H)⁺, 249 (M+H)⁺.
Analyse : C₁₀H₂₀N₂O₅ (248).
Calc. % : C 48,39 H 8,06 N 11,29
Tr. % : 8,57 8,08 11,08

30

1.2.2. N-(N-Boc-S-ACETYL-L-CYSTEINYL)-S-ACETYLCYSTEAMINE (4)

Une solution contenant 2,597 g (9,91 mmoles) de triphénylphosphine et 1,95 ml (9,91 mmoles) de diisopropyl azodicarboxylate dans 15 ml de THF est agitée 30 min à 0 °C (au bout
5 de 30 s d'agitation, on observe la formation d'un intense précipité). En conservant cette température, on additionne successivement 1,116 g (4,50 mmoles) de **3** en solution dans 6 ml de THF puis 707 µl (9,91 mmoles) d'acide thioacétique. On laisse ensuite la solution obtenue
10 revenir à la température ambiante et on poursuit l'agitation durant 12 h. Le mélange réactionnel est alors évaporé à sec sous vide. Le produit est isolé de la pâte résiduelle par « flash » chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : hexane puis AcOEt/éther de pétrole 75%). On recueille le composé attendu sous forme d'une gomme qui cristallise
15 dans un mélange d'AcOEt/éther de pétrole sous forme d'aiguilles incolores (1,21 g; Rdt = 74%). R_f (AcOEt/éther de pétrole, 4 : 6) : 0,35. $F = 111-113$ °C. $[\alpha]_D^{20} = -13,9^\circ$ (c 0,86; CHCl₃).

RMN ¹H (CDCl₃) δ ppm : 1,45 (s, 9H, *H* *t*-butyl); 2,36, 2,38 (2s, 2 x 3H, 2 x SC(=O)CH₃); 2,99-3,07 (m, 2H, NCH₂CH₂S); 3,19 (dd, *J* = 7,8; 14,3 Hz, 1H, β *H*_a cys); 3,34 (dd, *J* = 4,5; 14,3 Hz, 1H, β *H*_b cys); 3,40-3,50 (m, 2H, NCH₂CH₂S); 4,19-4,34 (m, 1H, α *H* cys); 5,25 (d, *J* = 7,1 Hz, 1H, NH cys); 6,69 (t, *J* = 5,2 Hz, 1H, NHCH₂).

SM : (FAB⁺/NBA) *m/z* 729 (2M+H)⁺, 365 (M+H)⁺.

Analyse : C₁₄H₂₄N₂O₅S₂ (364)

25 Calc. % : C 46,15 H 6,59 N 7,69

Tr. % : 46,45 6,51 7,47

1.2.3. N-(N-ACETYL-L-CYSTEINYL)-S-ACETYLCYSTEAMINE (I-152)

30 Une solution contenant 500 mg (1,37 mmole) de **4** dans 5 ml de CH₂Cl₂ est agitée, sous argon à 0 °C, puis additionnée de 1 ml (13,07

mmoles) de TFA. On laisse ensuite la solution revenir à la température ambiante et on poursuit l'agitation durant 7 h. A ce stade, la réaction contrôlée par CCM ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 9,4: 0,6) montre la disparition du composé de départ (R_f : 0,75) et l'apparition de deux spots plus polaires
5 (R_f : 0,5 et 0,16). Le mélange réactionnel est évaporé à sec sous vide (température du bain-marie : $<40^\circ\text{C}$).

Un nouveau contrôle par CCM, de la gomme obtenue, indique que le spot majoritaire précédent à R_f : 0,16 est devenu minoritaire au profit de celui à R_f : 0,5. On note également l'apparition d'un troisième spot,
10 de moindre importance, à R_f : 0,4. A ce stade, nous avons réalisé une « flash » chromatographie sur une aliquote de la gomme (20 mg) afin d'identifier les composés présents pour élucider ce phénomène:

- Avec un mélange d'éluants constitué de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{Et}_2\text{O}$ (5 : 5), on isole le produit de R_f : 0,5. L'étude de ses spectres (RMN ^1H et SM) montre,
15 sans ambiguïté, qu'il s'agit de la N-(2-méthyl- Δ^2 -thiazoliny)-4(R)-carbonyl)-S-acétylcystéamine **6** :

RMN ^1H (CDCl_3) δ ppm : 2,32 (s, 3H, SCOCH_3); 2,39 (d, $J = 1,3$ Hz, 3H, 2- CH_3 thiazoline); 3,05 (t app., $J = 6,4$ Hz, 2H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{S}$); 3,36-3,60 (m, 2H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{S}$); 3,69 (dd, $J = 10,2$; 11,4 Hz, 1H, 5- H thiazoline);
20 3,85 (dd, $J = 7,2$; 11,4 Hz, 1H, 5'- H thiazoline); 5,08 (ddd, $J = 1,3$; 7,2; 10,2 Hz, 1H, 4- H thiazoline); 7,45-7,58 (m, 1H, NHCH_2).

SM : (FAB $^+$ /G-T) m/z 493 (2M+H) $^+$, 247 (M+H) $^+$.

- En augmentant la polarité du solvant d'élution ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 9,5 : 0,5), on isole le composé intermédiaire (R_f : 0,4). L'étude de ses spectres
25 (RMN ^1H et SM) montre qu'il s'agit de la I-152. Ses données physico-chimiques sont rapportées à la fin de cette description.

- La poursuite de la chromatographie avec des éluants plus polaires ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 5-20%) n'a pas permis d'obtenir le produit de R_f : 0,16. Ce composé qui est le premier formé dans la réaction de déprotection de
30 la fonction amine terminale du N-Boc de départ ne peut être que le trifluoroacétate de la N-(S-acétyl-L-cystéinyl)-S-acétylcystéamine **5**.

* Tous les essais réalisés et contrôlés par CCM nous ont montré, dans nos conditions opérationnelles (temps nécessaire à la consommation totale du produit de départ, température et pH du milieu réactionnel), que **5**, qui est le premier formé lors de déprotection du N-Boc par le TFA, génère l'intermédiaire cyclique **6** qui s'hydrolyse ensuite lentement pour donner la I-152.

Ainsi, après ces différentes constatations, la gomme restante obtenue après évaporation du brut réactionnel a été solubilisée dans 150 ml de CH₂Cl₂ puis additonnée, à la température ambiante et sous forte agitation, de 5 ml d'eau. Après 6 h d'agitation, le contrôle par CCM ne montre plus qu'un seul spot correspondant au produit désiré. La phase organique est décantée et l'eau résiduelle est extraite avec du CH₂Cl₂ (3 x 10 ml). Les phases organiques sont ensuite rassemblées, séchées sur sulfate de sodium, filtrées et évaporées à sec sous vide. On recueille le composé attendu sous forme d'une pâte semi-cristalline. R_f (CH₂Cl₂/MeOH, 9,5 : 0,5) : 0,4. Cristallise dans un mélange d'AcOEt/éther de pétrole sous forme de microcristaux incolores (245 mg, Rdt = ≥67%). F = 122-124°C. [α]_D²⁰ = -40° (c 0,87; CHCl₃).

RMN ¹H (CDCl₃) δ ppm : 1,60 (dd, J = 7,6; 10,3 Hz, 1H, SH); 2,07 (s, 3H, NCOCH₃); 2,36 (s, 3H, SCOCCH₃); 2,70 (ddd, J = 6,5; 10,3; 13,9 Hz, 1H, β Ha cys); 3,03 (t, J = 6,3 Hz, 2H, NCH₂CH₂S); 3,06 (ddd, J = 4,3; 7,6; 13,9 Hz, 1H, β Hb cys); 3,46 (td, J = 6,0; 6,3 Hz, 2H, NCH₂CH₂S); 4,59 (ddd, J = 4,3; 6,5; 7,9 Hz, 1H, α H cys); 6,52 (d, J = 7,9 Hz, 1H, NH cys); 6,75-6,90 (m, 1H, NHCH₂).

SM : (FAB⁺/G-T) m/z 529 (2M+H)⁺, 265 (M+H)⁺.

Analyse : C₉H₁₆N₂O₃S₂ (264)

Calc. % : C 40,91 H 6,06 N 10,61 S 24,24

Tr. % : 41,21 6,00 10,91 23,99

EXEMPLE 2: SYNTHÈSE DE DÉRIVÉS ACYLES DE LA N-(N-ACÉTYL-L-CYSTEINYL)-S-ACÉTYLCYSTEAMINE (I-152) OU DE SES DÉRIVÉS

2.1. N-(N,S-BIS-ACÉTYL-L-CYSTEINYL)-S-ACÉTYLCYSTEAMINE (I-176)

5 (Méthode générale de S-acylation)

Une solution contenant 83 mg (0,31 mmole) de I-152 dans 1 ml de pyridine est agitée à 0 °C et additionnée de 90 µl (0,95 mmole) d'anhydride acétique. Le mélange réactionnel est maintenu 15 min à 0
10 °C puis on le laisse revenir à la température ambiante et on poursuit l'agitation durant 12 h. La solution est ensuite évaporée à sec sous vide et le résidu formé est repris avec 30 ml de CH₂Cl₂. La phase organique est lavée à l'eau (3 x 20 ml), séchée sur sulfate de sodium, filtrée et évaporée à sec sous vide. La gomme résiduelle est cristallisée dans de
15 l'AcOEt et fournit 73 mg (Rdt = 75%) du composé attendu sous forme de plaquettes incolores. R_f (CH₂Cl₂/MeOH, 9,5 : 0,5) : 0,46. F = 153-154 °C. [α]_D²⁰ = -33,7° (c 0,8; CHCl₃).

RMN ¹H (CDCl₃) δ ppm : 2,02 (s, 3H, NCOCH₃); 2,37, 2,39 (2s, 2 x 3H, 2 x SCOCH₃); 2,93, 3,12 (m, 2H, NCH₂CH₂S); 3,24 (dd, J = 7,2; 14,5 Hz,
20 1H, β Ha cys); 3,31 (dd, J = 5,2; 14,5 Hz, 1H, β Hb cys); 3,39-3,49 (m, 2H, NCH₂CH₂S); 4,54 (ddd, J = 5,3; 7,2; 7,3 Hz, 1H, α H cys); 6,44 (d, J = 7,3 Hz, 1H, NH cys); 6,83 (t, J = 5,1 Hz, 1H, NHCH₂).

SM : (FAB⁺/G-T) m/z 613 (2M+H)⁺, 307 (M+H)⁺.

Analyse : C₁₁H₁₈N₂O₄S₂ (306)

25 Calc. % : C 43,14 H 5,88 N 9,15 S 20,92

Tr. % : 42,95 5,96 8,93 20,64

2.2. N-(N-ACÉTYL-S-ISOBUTYRYL-L-CYSTEINYL)-S-ACÉTYLCYSTEAMINE (I-177)

30

La réaction d'acylation de 85 mg (0,32 mmole) de I-152 est réalisée, selon la méthode générale précédemment décrite, en utilisant

137 μ l (1,30 mmole) de chlorure d'isobutyryle à la place de l'anhydride acétique. Le mélange visqueux obtenu, après évaporation à sec sous vide, est ensuite dilué avec 30ml de CH_2Cl_2 . La solution est ensuite lavée (eau, 10 ml; bicarbonate de sodium saturé et glacé, 10 ml; eau, 10 ml; acide citrique 0,1N glacé, 10 ml; eau, 3 x 10 ml), séchée sur sulfate de sodium, filtrée et évaporée à sec sous vide. Le produit d'acylation est isolé de la gomme obtenue par « flash » chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : CH_2Cl_2 /éther 50%). On recueille 60 mg (Rdt = 56%) du composé attendu. R_f (CH_2Cl_2 /MeOH, 9,4 : 0,6) : 0,6. Cristallise dans un mélange d'AcOEt/éther de pétrole sous forme de plaquettes incolores. $F = 116-118^\circ\text{C}$. $[\alpha]_D^{20} = -18,4^\circ$ (c 0,87; CHCl_3).

RMN ^1H (CDCl_3) δ ppm : 1,20 (d, $J = 6,9$ Hz, 6H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$; 2,00 (s, 3H, NCOCH_3); 2,37 (s, 3H, SCOCH_3); 2,80 (hept, $J = 6,9$ Hz, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$; 2,93, 3,12 (m, 2H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{S}$); 3,23-3,30 (m, 2H, β CH_2 cys); 3,38-3,49 (m, 2H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{S}$); 4,46-4,57 (m, 1H, α H cys); 6,42 (d, $J = 7,3$ Hz, 1H, NH cys); 6,80 (t, $J = 5,2$ Hz, 1H, NHCH_2).

SM : (FAB $^+$ /G-T) m/z 669 (2M+H) $^+$, 335 (M+H) $^+$.

Analyse : $\text{C}_{13}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}_2$ (334)

Calc. % : C 46,71 H 6,59 N 8,38 S 19,16

Tr. % : 46,76 6,89 8,24 19,32

2.3. *N-(N-ACETYL-S-PIVALOYL-L-CYSTEINYL)-S-ACETYLCYSTEAMINE (I-178)*

La réaction d'acylation de 95 mg (0,36 mmole) de **I-152** est réalisée, selon la méthode généralement décrite, en utilisant 176 μ l (1,44 mmole) de chlorure de pivaloyle à la place de l'anhydride acétique. Le mélange visqueux obtenu, après évaporation à sec sous vide, est ensuite dilué avec 30 ml de CH_2Cl_2 . La solution est ensuite lavée (eau, 10 ml; bicarbonate de sodium saturé et glacé, 10 ml; eau, 10 ml; acide citrique 0,1N glacé, 10 ml; eau, 3 x 10 ml), séchée sur sulfate de sodium, filtrée et évaporée à sec sous vide. Le produit d'acylation est isolé de la gomme obtenue par « flash » chromatographie sur colonne de

gel de silice (éluant : CH₂Cl₂/éther 50%). On recueille 70 mg (Rdt = 56%) du composé attendu. R_f (CH₂Cl₂/éther, 4 : 6) : 0,23. Cristallise dans un mélange d' AcOEt/éther de pétrole sous forme de plaquettes incolores. F = 92-94 °C. [α]_D²⁰ = -11,1° (c 1,08; CHCl₃).

5 RMN ¹H (CDCl₃) δ ppm : 1,25 (s, 9H, C(CH₃)₃); 2,00 (s, 3H, NCOCH₃); 2,37 (s, 3H, SCOCH₃); 2,94, 3,12 (m, 2H, NCH₂CH₂S); 3,25 (d, J = 6,5 Hz, 2H, β CH₂ cys); 3,38-3,49 (m, 2H, NCH₂CH₂S); 4,51 (td, J = 6,5, 7,3 Hz, 1H, α H cys); 6,42 (d, J = 7,3 Hz, 1H, NH cys); 6,80 (t, J = 5,2 Hz, 1H, NHCH₂).

10 SM : (FAB⁺/G-T) m/z 697 (2M+H)⁺, 349 (M+H)⁺.

Analyse : C₁₄H₂₄N₂O₄S₂ (348)

Calc. % : C 48,28 H 6,90 N 8,05 S 18,39

Tr. % : 48,32 6,95 7,94 18,43

15 **2.4. N-(N-ACETYL-S-TRITYL-L-CYSTEINYL)-S-ISOBUTYRYL-CYSTEAMINE (10)**

La réaction de couplage de **7** (4,5 mmoles) avec le chlorhydrate de S-isobutyrylcystéamine [(composé obtenu selon les mêmes méthodes
20 que celles décrites par T. Wieland et E. Bokelman, *Ann. Chem.*, 1952, 576, 20-34; lors des synthèses des chlorhydrates des S-acétyl et S-benzoylcystéamines) F = 147-148°C] est réalisée selon la méthode B décrite dans la première voie de synthèse (exemple 1). Après les différents traitements, le composé attendu est isolé par "flash"
25 chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : CH₂Cl₂/éther 30%). On recueille **10**, sous forme d'une mousse incolore, avec un rendement de 80%. R_f (AcOEt/éther de pétrole, 8 : 2) : 0,37. [α]_D²⁰ = +10° (c 1,1; CHCl₃).

RMN ¹H (CDCl₃) δ ppm : 1,16 (d, J = 6,9 Hz, 6H, C(CH₃)₂); 1,90 (s, 3H, NCOCH₃); 2,49 (dd, J = 5,7; 12,9 Hz, 1H, β Ha cys); 2,70 (hept, J = 6,9
30 Hz, 1H, CH(CH₃)₂); 2,79 (dd, J = 6,4; 12,9 Hz, 1H, β Hb cys); 2,88-3,01

(m, 2H, NCH₂CH₂S); 3,29-3,41 (m, 2H, NCH₂CH₂S); 4,08-4,19 (m, 1H, α H cys); 5,76 (d, J = 7,7 Hz, 1H, NH cys); 6,36 (t, J = 5,5 Hz, 1H, NHCH₂); 7,15-7,35, 7,38-7,52 (2m, 15H, H aromatiques).

SM : (FAB⁺/G-T) *m/z* 535 (M+H)⁺.

5 Analyse : C₃₀H₃₄N₂O₃S₂ (534)

Calc. % : C 67,42 H 6,37 N 5,24

Tr. % : 67,25 6,58 5,30

2.5. N-(N-ACETYL-L-CYSTEINYL)-S-ISOBUTYRYLCYSTEAMINE (I-188)

10

Ce composé est obtenu par la S-détritylation de **10** (2,38 mmoles). Le protocole utilisé est le même que celui décrit dans l'exemple 1 pour la synthèse de la **I-152**. Après les différents traitements, on recueille une gomme qui est purifiée par "flash" chromatographie sur colonne
15 de gel de silice (éluant : CH₂Cl₂/MeOH 1,5%). On isole la **I-188**, sous forme d'une gomme semi-critalline incolore, avec un rendement de 57%.

R_f (CH₂Cl₂/MeOH, 9,5 : 0,5) : 0,45. [α]_D²⁰ = -26,6° (c 1,09; CHCl₃).

RMN ¹H (CDCl₃) δ ppm : 1,21 (d, J = 6,9 Hz, 6H, C(CH₃)₂); 1,61 (dd, J
= 7,6; 10,3 Hz, 1H, SH); 2,09 (s, 3H, NCOCH₃); 2,70 (ddd, J = 6,4; 10,3;
20 13,8 Hz, 1H, β Ha cys); 2,77 (hept, J = 6,9 Hz, 1H, CH(CH₃)₂); 2,99-
3,08 (m, 2H, NCH₂CH₂S); 3,09 (ddd, J = 4,1; 7,6; 13,8 Hz, 1H, β Hb
cys); 3,41-3,53 (m, 2H, NCH₂CH₂S); 4,60 (ddd, J = 4,1; 6,4; 7,5 Hz, 1H,
 α H cys); 6,48 (d, J = 7,5 Hz, 1H, NH cys); 6,68-6,88 (m, 1H, NHCH₂).

SM : (FAB⁺/G-T) *m/z* 585 (2M+H)⁺, 293 (M+H)⁺.

25 Analyse : C₁₁H₂₀N₂O₃S₂ (292)

Calc. % : C 45,20 H 6,85 N 9,59

Tr. % : 45,31 7,09 9,41

2.6. *N-(N,S-BIS-ACETYL-L-CYSTEINYL)-S-ISOBUTYRYLCYSTEAMINE (I-189)*

La S-acylation de la **I-188** (0,32 mmole), avec de l'anhydride acétique, est réalisée selon la méthode générale décrite dans l'exemple 2. Le mélange réactionnel est ensuite traité suivant le protocole décrit pour la synthèse de la **I-177**. Après les différents traitements, on recueille une gomme qui est purifiée par "flash" chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : CH₂Cl₂/éther 55%). On isole la **I-189** sous forme d'une gomme (Rdt = 64%) qui, après trituration dans de l'hexane, fournit une poudre incolore. R_f (CH₂Cl₂/MeOH, 9,5 : 0,5) : 0,58. F = 115-117°C. $[\alpha]_D^{20} = -20,2^\circ$ (c 1,04; CHCl₃).

RMN ¹H (CDCl₃) δ ppm : 1,20 (d, J = 6,9 Hz, 6H, C(CH₃)₂); 2,02 (s, 3H, NCOCH₃); 2,38 (s, 3H, SCOCH₃); 2,78 (hept, J = 6,9 Hz, 1H, CH(CH₃)₂); 2,96-3,06 (m, 2H, NCH₂CH₂S); 3,19-3,36 (m, 2H, CH₂ cys); 3,38-3,48 (m, 2H, NCH₂CH₂S); 4,47-4,60 (m, 1H, α H cys); 6,37 (d, J = 7,1 Hz, 1H, NH cys); 6,70-6,83 (m, 1H, NHCH₂).

SM : (FAB⁺/G-T) m/z 669 (2M+H)⁺, 335 (M+H)⁺.

Analyse : C₁₃H₂₂N₂O₄S₂ (334)

Calc. % : C	46,71	H	6,59	N	8,38
Tr. % :	46,81		6,62		8,36

2.7. *N-(N-ACETYL-S-ISOBUTYRYL-L-CYSTEINYL)-S-ISOBUTYRYL-CYSTEAMINE (I-190)*

La S-acylation de la **I-188** (0,32 mmole), avec du chlorure d'isobutyryle, est réalisée selon la méthode générale décrite dans l'exemple 2. Le mélange réactionnel est ensuite traité suivant le protocole décrit pour la synthèse de la **I-177**. Après les différents traitements, on recueille une gomme qui est purifiée par "flash" chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : CH₂Cl₂/éther

50%). On isole la **I-190** sous forme d'une gomme (Rdt = 63%) qui, après trituration dans de l'hexane, fournit une poudre incolore. R_f (CH₂Cl₂/éther, 3,5 : 6,5) : 0,34. F = 99-100°C. [α]_D²⁰ = -9,1° (c 0,88; CHCl₃).

5 RMN ¹H (CDCl₃) δ ppm : 1,20 (d, J = 6,9 Hz, 12H, C(CH₃)₂); 2,01 (s, 3H, NCOCH₃); 2,78 (hept, J = 6,9 Hz, 2H, CH(CH₃)₂); 2,92-3,10 (m, 2H, NCH₂CH₂S); 3,26 (d, J = 6,4 Hz, 2H, CH₂ cys); 3,37-3,48 (m, 2H, NCH₂CH₂S); 4,46-4,58 (m, 1H, α H cys); 6,38 (d, J = 7,3 Hz, 1H, NH cys); 6,73-6,83 (m, 1H, NHCH₂).

10 SM : (FAB⁺/G-T) m/z 725 (2M+H)⁺, 363 (M+H)⁺.

Analyse : C₁₅H₂₆N₂O₄S₂ (362)

Calc. % : C 49,72 H 7,18 N 7,73

Tr. % : 49,57 7,19 7,68

15 **2.8. N-(N-ACETYL-S-PIVALOYL-L-CYSTEINYL)-S- ISOBUTYRYL-CYSTEAMINE (I-191)**

La S-acylation de la **I-188** (0,32 mmole), avec du chlorure d'isobutyryle, est réalisée selon la méthode générale décrite dans l'exemple 2. Le mélange réactionnel est ensuite traité suivant le protocole décrit pour la synthèse de la **I-177**. Après les différents traitements, on recueille une gomme qui cristallise dans un mélange d'AcOEt/ éther de pétrole en aiguilles incolores (Rdt = 68%). R_f (CH₂Cl₂/éther, 5 : 5) : 0,27. F = 103-104°C. [α]_D²⁰ = -8,3° (c 0,97; CHCl₃).

25 RMN ¹H (CDCl₃) δ ppm : 1,20 (d, J = 6,9 Hz, 6H, C(CH₃)₂); 1,25 (s, 9H, C(CH₃)₃); 2,01 (s, 3H, NCOCH₃); 2,77 (hept, J = 6,9 Hz, 1H, CH(CH₃)₂); 2,94-3,08 (m, 2H, NCH₂CH₂S); 3,25 (d, J = 6,4 Hz, 2H, CH₂ cys); 3,37-

3,49 (m, 2H, NCH₂CH₂S); 4,44-4,57 (m, 1H, α H cys); 6,35 (d, J = 7,3 Hz, 1H, NH cys); 6,69-6,80 (m, 1H, NHCH₂).

SM : (FAB⁺/G-T) m/z 753 (2M+H)⁺, 377 (M+H)⁺.

Analyse : C₁₆H₂₈N₂O₄S₂ (376)

5	Calc. % : C 51,06	H 7,45	N 7,45
	Tr. % : 51,16	7,53	7,44

2.9. N-(N-ACETYL-S-BENZOYL-L-CYSTEINYL)-S-ISOBUTYRYL-CYSTEAMINE (I-192)

10

La S-acylation de la **I-188** (0,32 mmole), avec du chlorure de benzoyle, est réalisée selon la méthode générale décrite dans l'exemple 2. Le mélange réactionnel est ensuite traité suivant le protocole décrit pour la synthèse de la **I-177**. Après les différents traitements, on recueille une gomme qui est purifiée par "flash" chromatographie sur
 15 colonne de gel de silice (éluant : CH₂Cl₂/éther 35%). On isole la **I-192** sous forme d'une gomme (Rdt = 63%) qui, après trituration dans de l'hexane, fournit une poudre incolore. R_f (CH₂Cl₂/éther, 5 : 5) : 0,27. F = 137-138°C. $[\alpha]_D^{20} = +2,8^\circ$ (c 1,08; CHCl₃).

20 RMN ¹H (CDCl₃) δ ppm : 1,18 (d, J = 6,9 Hz, 6H, C(CH₃)₂); 2,02 (s, 3H, NCOCH₃); 2,73 (hept, J = 6,9 Hz, 1H, CH(CH₃)₂); 2,96-3,06 (m, 2H, NCH₂CH₂S); 3,39-3,49 (m, 2H, NCH₂CH₂S); 3,50 (d, J = 6,2 Hz, 2H, CH₂ cys); 4,60-4,72 (m, 1H, α H cys); 6,59 (d, J = 7,3 Hz, 1H, NH cys); 6,85-6,97 (m, 1H, NHCH₂); 7,41-7,52, 7,57-7,65, 7,93-8,01 (3m, 5H, H
 25 aromatiques).

SM : (FAB⁺/G-T) m/z 793 (2M+H)⁺, 397 (M+H)⁺.

Analyse : C₁₈H₂₄N₂O₄S₂ (396)

Calc. % : C 54,55	H 6,06	N 7,07
Tr. % : 54,89	6,11	7,06

2.10. N-(N-ACETYL-S-TRITYL-L-CYSTEINYL)-S-PIVALOYL-CYSTEAMINE (11)

La réaction de couplage de **7** (7,4 mmoles) avec le chlorhydrate de
 5 S-pivaloylcystéamine [(composé obtenu selon les mêmes méthodes que
 celles décrites par T. Wieland et E. Bokelman, *Ann. Chem.*, 1952, 576,
 20-34 lors des synthèses des chlorhydrates des S-acétyl et S-
 benzoylcystéamines) F = 212-213°C] est réalisée selon la méthode B
 décrite dans la première voie de synthèse (exemple 1). Après les
 10 différents traitements, le composé attendu est isolé par "flash"
 chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : CH₂Cl₂/éther
 30%). On recueille **11**, sous forme d'une mousse incolore, avec un
 rendement de 86%. R_f (AcOEt/éther de pétrole, 7 : 3) : 0,5. $[\alpha]_D^{20} =$
 +8,5° (c 1,29; CHCl₃).

15 RMN ¹H (CDCl₃) δ ppm : 1,21 (s, 9H, C(CH₃)₃); 1,90 (s, 3H, NCOCH₃);
 2,49 (dd, J = 5,9; 12,9 Hz, 1H, α H_a cys); 2,78 (dd, J = 6,5; 12,9 Hz, 1H,
 β H_b cys); 2,88-2,98 (m, 2H, NCH₂CH₂S); 3,28-3,40 (m, 2H,
 NCH₂CH₂S); 4,06-4,19 (m, 1H, α H cys); 5,77 (d, J = 7,6 Hz, 1H, NH
 cys); 6,27-6,41 (m, 1H, NHCH₂); 7,16-7,35, 7,40-7,48 (2m, 15H, H
 20 aromatiques).

SM : (FAB⁺/G-T) m/z 549 (M+H)⁺.

Analyse : C₃₁H₃₆N₂O₃S₂ (548)

Calc. % : C 67,88 H 6,57 N 5,11

Tr. % : 66,73 6,70 5,17

25

2.11. N-(N-ACETYL-L-CYSTEINYL)-S-PIVALOYLCYSTEAMINE (I-193)

Ce composé est obtenu par la S-détritylation de **11** (4,57 mmoles).
 Le protocole utilisé est le même que celui décrit dans l'exemple 1 pour
 30 la synthèse de la **I-152**. Après les différents traitements, on recueille
 une gomme qui est purifiée par "flash" chromatographie sur colonne

de gel de silice (éluant : CH₂Cl₂/MeOH 1,5%). On isole la **I-193**, sous forme d'une gomme semi-critalline incolore, avec un rendement de 60%.

R_f (CH₂Cl₂/MeOH, 9,5 : 0,5) : 0,49. $[\alpha]_D^{20} = -20,2^\circ$ (c 0,94; CHCl₃).

RMN ¹H (CDCl₃) δ ppm : 1,24 (s, 9H, C(CH₃)₃); 1,61 (dd, J = 7,6; 10,3 Hz, 1H, SH); 2,08 (s, 3H, NCOCH₃); 2,70 (ddd, J = 6,4; 10,3; 13,9 Hz, 1H, β Ha cys); 2,97-3,09 (m, 2H, NCH₂CH₂S); 3,08 (ddd, J = 4,1; 7,6; 13,9 Hz, 1H, β Hb cys); 3,40-3,52 (m, 2H, NCH₂CH₂S); 4,60 (ddd, J = 4,1; 6,4; 7,8 Hz, 1H, α H cys); 6,49 (d, J = 7,8 Hz, 1H, NH cys); 6,69-6,82 (m, 1H, NHCH₂).

SM : (FAB⁺/G-T) m/z 613 (2M+H)⁺, 307 (M+H)⁺.

Analyse : C₁₂H₂₂N₂O₃S₂ (306)

Calc. % : C 47,06 H 7,19 N 9,15

Tr. % : 47,37 7,23 9,22

2.12. N-(N,S-BIS-ACETYL-L-CYSTEINYL)-S-PIVALOYL-CYSTEAMINE (I-194)

La S-acylation de la **I-193** (0,33 mmole), avec de l'anhydride acétique, est réalisée selon la méthode générale décrite dans l'exemple 2. Le mélange réactionnel est ensuite traité suivant le protocole décrit pour la synthèse de la **I-177**. Après les différents traitements, on recueille une gomme qui est purifiée par "flash" chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : CH₂Cl₂/éther 55%). On isole la **I-194** sous forme d'une gomme (Rdt = 71%) qui cristallise dans un mélange d'AcOEt/éther de pétrole en plaquettes incolores. R_f (CH₂Cl₂/MeOH, 9,5 : 0,5) : 0,58. F = 112-114°C. $[\alpha]_D^{20} = -13,8^\circ$ (c 0,94; CHCl₃).

RMN ¹H (CDCl₃) δ ppm : 1,24 (s, 9H, C(CH₃)₃); 2,03 (s, 3H, NCOCH₃); 2,38 (s, 3H, SCOCH₃); 2,94-3,04 (m, 2H, NCH₂CH₂S); 3,18-3,36 (m,

2H, CH₂ cys); 3,36-3,48 (m, 2H, NCH₂CH₂S); 4,48-4,60 (m, 1H, α H cys); 6,40 (d, J = 7,5 Hz, 1H, NH cys); 6,71-6,83 (m, 1H, NHCH₂).

SM : (FAB⁺/G-T) *m/z* 697 (2M+H)⁺, 349 (M+H)⁺.

Analyse : C₁₄H₂₄N₂O₄S₂ (348)

5	Calc. % : C 48,28	H 6,90	N 8,05
	Tr. % : 48,34	7,00	7,97

2.13. N-(N-ACETYL-S-ISOBUTYRYL-L-CYSTEINYL)-S- PIVALOYL-CYSTEAMINE (I-195)

10

La S-acylation de la **I-193** (0,32 mmole), avec du chlorure d'isobutyryle, est réalisée selon la méthode générale décrite dans l'exemple 2. Le mélange réactionnel est ensuite traité suivant le protocole décrit pour la synthèse de la **I-177**. Après les différents
 15 traitements, on recueille une gomme qui, après triturations dans de l'hexane, fournit une poudre incolore homogène sur CCM (Rdt = 56%).
 R_f (CH₂Cl₂/éther, 3,5 : 6,5) : 0,46. F = 101-102°C. [α]_D²⁰ = -5,7° (c 1,05; CHCl₃).

RMN ¹H (CDCl₃) δ ppm : 1,20 (d, J = 6,9 Hz, 6H, C(CH₃)₂); 1,25 (s, 9H, C(CH₃)₃); 2,01 (s, 3H, NCOCH₃); 2,79 (hept, J = 6,9 Hz, 1H, CH(CH₃)₂);
 20 2,90-3,08 (m, 2H, NCH₂CH₂S); 3,25 (d, J = 6,3 Hz, 2H, CH₂ cys); 3,35-3,47 (m, 2H, NCH₂CH₂S); 4,46-4,58 (m, 1H, α H cys); 6,38 (d, J = 7,1 Hz, 1H, NH cys); 6,71-6,81 (m, 1H, NHCH₂).

SM : (FAB⁺/G-T) *m/z* 753 (2M+H)⁺, 377 (M+H)⁺.

25 Analyse : C₁₆H₂₈N₂O₄S₂ (376)

Calc. % : C 51,06	H 7,45	N 7,45
Tr. % : 51,20	7,49	7,46

2.14. N-(N-ACETYL-S-PIVALOYL-L-CYSTEINYL)-S-PIVALOYL-CYSTEAMINE (I-196)

La S-acylation de la **I-193** (0,34 mmole), avec du chlorure de pivaloyle, est réalisée selon la méthode générale décrite dans l'exemple 2. Le mélange réactionnel est ensuite traité suivant le protocole décrit pour la synthèse de la **I-177**. Après les différents traitements, on recueille une gomme qui, après triturations dans de l'hexane, fournit une poudre incolore (Rdt = 66%). R_f (CH_2Cl_2 /éther, 5 : 5) : 0,36. Cristallise dans un mélange d'AcOEt/éther de pétrole sous forme de microcristaux incolores. $F = 109-111^\circ\text{C}$. $[\alpha]_D^{20} = -4,4^\circ$ (c 0,91; CHCl_3). RMN ^1H (CDCl_3) δ ppm : 1,24 (s, 18H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 2,00 (s, 3H, NCOCH_3); 2,90-3,08 (m, 2H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{S}$); 3,24 (d, $J = 6,4$ Hz, 2H, CH_2 cys); 3,36-3,47 (m, 2H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{S}$); 4,44-4,57 (m, 1H, α H cys); 6,38 (d, $J = 7,4$ Hz, 1H, NH cys); 6,68-6,88 (m, 1H, NHCH_2).

SM : ($\text{FAB}^+/\text{G-T}$) m/z 781 ($2\text{M}+\text{H}$) $^+$, 391 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

Analyse : $\text{C}_{17}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}_2$ (390)

Calc. % : C 52,31 H 7,69 N 7,18

Tr. % : 52,47 7,70 7,14

2.15. N-(N-ACETYL-S-BENZOYL-L-CYSTEINYL)-S-PIVALOYL-CYSTEAMINE (I-197)

La S-acylation de la **I-193** (0,34 mmole), avec du chlorure de benzoyle, est réalisée selon la méthode générale décrite dans l'exemple 2. Le mélange réactionnel est ensuite traité suivant le protocole décrit pour la synthèse de la **I-177**. Après les différents traitements, on recueille une gomme qui est purifiée par "flash" chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : CH_2Cl_2 /éther 35%). On isole la **I-197** sous forme d'une gomme qui, après trituration dans de l'hexane, fournit

une poudre incolore (Rdt = 66%). R_f (CH₂Cl₂/éther, 5 : 5) : 0,33. F = 133-134°C. $[\alpha]_D^{20} = +5,10^\circ$ (c 0,98; CHCl₃).

RMN ¹H (CDCl₃) δ ppm : 1,21 (s, 9H, C(CH₃)₃); 2,01 (s, 3H, NCOCH₃); 2,90-3,08 (m, 2H, NCH₂CH₂S); 3,33-3,52 (m, 4H, NCH₂CH₂S, CH₂ cys); 4,64-4,77 (m, 1H, α H cys); 6,76 (d, J = 7,4 Hz, 1H, NH cys); 7,06-7,22 (m, 1H, NHCH₂); 7,40-7,50, 7,55-7,63, 7,91-8,0 (3m, 5H, H aromatiques).

SM : (FAB⁺/G-T) m/z 821 (2M+H)⁺, 411 (M+H)⁺.

Analyse : C₁₉H₂₆N₂O₄S₂ (410)

10	Calc. % : C 55,61	H 6,34	N 6,83
	Tr. % : 55,29	6,35	6,75

2.16. N-(N-ACETYL-S-TRITYL-L-CYSTEINYL)-S-BENZOYL-CYSTEAMINE (12)

15 La réaction de couplage de **7** (7,41 mmoles) est réalisée selon la méthode B décrite dans la première voie de synthèse (exemple 1): le chlorhydrate de S-acétylcystéamine a été remplacé par le chlorhydrate de S-benzoylcystéamine (T. Wieland et E. Bokelman, *Ann. Chem.*, 1952, 576, 20-34). Après les différents traitements, le composé attendu est
20 isolé par " flash " chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : CH₂Cl₂/éther 15%). On recueille **12**, sous forme d'une mousse incolore, avec un rendement de 62%. R_f (AcOEt/éther de pétrole, 7 : 3) : 0,42. $[\alpha]_D^{20} = +10,8^\circ$ (c 1,11; CHCl₃).

RMN ¹H (CDCl₃) δ ppm : 1,86 (s, 3H, NCOCH₃); 2,47 (dd, J = 5,7; 13,0
25 Hz, 1H, β H_a cys); 2,82 (dd, J = 6,4; 13,0 Hz, 1H, β H_b cys); 3,08-3,27 (m, 2H, NCH₂CH₂S); 3,41-3,53 (m, 2H, NCH₂CH₂S); 4,08-4,21 (m, 1H, α H cys); 5,67 (d, J = 7,7 Hz, 1H, NH cys); 6,34-6,46 (m, 1H, NHCH₂); 7,17-7,32, 7,37-7,45, 7,54-7,61, 7,89-7,96 (4m, 20H, H aromatiques).

SM : (FAB⁺/G-T) m/z 569 (M+H)⁺.

Analyse : C₃₃H₃₂N₂O₃S₂ (568)

Calc. % : C 69,72 H 5,63 N 4,93

Tr. % : 68,96 5,62 4,89

5 **2.17. N-(N-ACETYL-L-CYSTEINYL)-S-BENZOYL-CYSTEAMINE (I-198)**

 Ce composé est obtenu par la S-détritylation de **12** (4,44 mmoles).
Le protocole utilisé est le même que celui décrit dans l'exemple 1 pour
la synthèse de la **I-152**. Après les différents traitements, on recueille
10 une gomme qui est purifiée par " flash " chromatographie sur colonne
de gel de silice (éluant : AcOEt/éther de pétrole 50%). On isole la **I-198**,
sous forme d'un solide blanc, avec un rendement de 63%. R_f
(CH₂Cl₂/MeOH, 9,5 : 0,5) : 0,38. F = 128-130°C. [α]_D²⁰ = -24,7° (c
1,01; CHCl₃).

15 RMN ¹H (CDCl₃) δ ppm : 1,59 (dd, J = 7,6; 10,2 Hz, 1H, SH); 2,04 (s,
3H, NCOCH₃); 2,71 (ddd, J = 6,5; 10,2; 13,8 Hz, 1H, β Ha cys); 3,06
(ddd, J = 4,3; 7,6; 13,8 Hz, 1H, β Hb cys); 3,20-3,31 (m, 2H,
NCH₂CH₂S); 3,52-3,64 (m, 2H, NCH₂CH₂S); 4,61 (ddd, J = 4,3; 6,5;
7,4 Hz, 1H, α H cys); 6,51 (d, J = 7,4 Hz, 1H, NH cys); 6,83-7,00 (m, 1H,
20 NHCH₂); 7,43-7,52, 7,56-7,65, 7,92-8,00 (3m, 5H, H aromatiques).

SM : (FAB⁺/G-T) m/z 653 (2M+H)⁺, 327 (M+H)⁺.

Analyse : C₁₄H₁₈N₂O₃S₂ (326)

Calc. % : C 51,53 H 5,52 N 8,59

Tr. % : 51,49 5,55 8,60

25

2.18. N-(N,S-BIS-ACETYL-L-CYSTEINYL)-S-BENZOYL-CYSTEAMINE (I-199)

 La S-acylation de la **I-198** (0,34 mmole), avec de l'anhydride
acétique, est réalisée selon la méthode générale décrite dans l'exemple
30 2. Le mélange réactionnel est ensuite traité suivant le protocole décrit

pour la synthèse de la **I-177**. Après les différents traitements, on recueille une gomme qui est purifiée par "flash" chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : CH₂Cl₂/MeOH 1,5%). On isole la **I-199** sous forme d'une gomme (Rdt = 75%) qui cristallise de l'AcOEt en d'aiguilles incolores. R_f (CH₂Cl₂/MeOH, 9,5 : 0,5) : 0,44. F = 166-168°C. $[\alpha]_D^{20} = -14,3^\circ$ (c 0,98; CHCl₃).

RMN ¹H (CDCl₃) δ ppm : 1,99 (s, 3H, NCOCH₃); 2,32 (s, 3H, SCOCH₃); 3,18-3,31 (m, 4H, NCH₂CH₂S, CH₂ cys); 3,48-3,61 (m, 2H, NCH₂CH₂S); 4,49-4,62 (m, 1H, α H cys); 6,38 (d, J = 7,6 Hz, 1H, NH cys); 6,79-6,92 (m, 1H, NHCH₂); 7,42-7,51, 7,55-7,64, 7,93-8,01 (3m, 5H, H aromatiques).

SM : (FAB⁺/G-T) m/z 737 (2M+H)⁺, 369 (M+H)⁺.

Analyse : C₁₆H₂₀N₂O₄S₂ (368)

Calc. % :	C 52,17	H 5,43	N 7,61
Tr. % :	52,33	5,45	7,68

2.19. N-(N-ACETYL-S-ISOBUTYRYL-L-CYSTEINYL)-S-BENZOYL-CYSTEAMINE (I-200)

La S-acylation de la **I-198** (0,30 mmole), avec du chlorure d'isobutyryle, est réalisée selon la méthode générale décrite dans l'exemple 2. Le mélange réactionnel est ensuite traité suivant le protocole décrit pour la synthèse de la **I-177**. Après les différents traitements, on recueille une gomme qui est purifiée par "flash" chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : CH₂Cl₂/éther 40%). On isole la **I-200** sous forme d'une gomme (Rdt = 79%) qui cristallise dans un mélange d'AcOEt/éther de pétrole en plaquettes incolores. R_f (CH₂Cl₂/éther, 3 : 7) : 0,2. F = 135-136°C. $[\alpha]_D^{20} = -6,7^\circ$ (c 1,2; CHCl₃).

RMN ^1H (CDCl_3) δ ppm : 1,17 (d, $J = 6,9$ Hz, 6H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$); 1,97 (s, 3H, NCOCH_3); 2,75 (hept, $J = 6,9$ Hz, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$); 3,19-3,30 (m, 4H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{S}$, CH_2 cys); 3,46-3,62 (m, 2H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{S}$); 4,49-4,61 (m, 1H, α H cys); 6,41 (d, $J = 7,4$ Hz, 1H, NH cys); 6,85-6,96 (m, 1H, NHCH₂); 7,41-7,52, 7,55-7,64, 7,90-8,02 (3m, 5H, H aromatiques).

SM : $(\text{FAB}^+/\text{G-T})$ m/z 793 $(2\text{M}+\text{H})^+$, 397 $(\text{M}+\text{H})^+$.

Analyse : $\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}_2$ (396)

Calc. % : C 54,54 H 6,06 N 7,07

Tr. % : 54,77 6,04 7,07

10

2.20. *N*-(*N*-ACETYL-*S*-PIVALOYL-*L*-CYSTEINYL)-*S*-BENZOYL-CYSTEAMINE (I-201)

La S-acylation de la **I-198** (0,30 mmole), avec du chlorure de pivaloyle, est réalisée selon la méthode générale décrite dans l'exemple 2. Le mélange réactionnel est ensuite traité suivant le protocole décrit pour la synthèse de la **I-177**. Après les différents traitements, on recueille une gomme qui est purifiée par "flash" chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : CH_2Cl_2 /éther 45%). On isole la **I-201** sous forme d'une gomme (Rdt = 83%) qui cristallise dans un mélange d'AcOEt/éther de pétrole en plaquettes incolores. R_f (CH_2Cl_2 /éther, 3 : 7) : 0,3. $F = 101-103^\circ\text{C}$. $[\alpha]_D^{20} = -3,8^\circ$ (c 1,05; CHCl_3).

RMN ^1H (CDCl_3) δ ppm : 1,22 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 1,96 (s, 3H, NCOCH_3); 3,19-3,30 (m, 4H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{S}$, CH_2 cys); 3,46-3,62 (m, 2H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{S}$); 4,47-4,58 (m, 1H, α H cys); 6,38 (d, $J = 7,2$ Hz, 1H, NH cys); 6,81-6,92 (m, 1H, NHCH₂); 7,42-7,52, 7,55-7,65, 7,90-8,02 (3m, 5H, H aromatiques).

SM : $(\text{FAB}^+/\text{G-T})$ m/z 821 $(2\text{M}+\text{H})^+$, 411 $(\text{M}+\text{H})^+$.

Analyse : $\text{C}_{19}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}_2$ (410)

Calc. % : C 55,61 H 6,34 N 6,83

30

Tr. % : 55,73 6,29 6,85

2.21. N-(N-ACETYL-S-BENZOYL-L-CYSTEINYL)-S-BENZOYL-CYSTEAMINE (I-202)

5

La S-acylation de la **I-198** (0,30 mmole), avec du chlorure de benzoyle, est réalisée selon la méthode générale décrite dans l'exemple 2. Le mélange réactionnel est ensuite traité suivant le protocole décrit pour la synthèse de la **I-177**. Après les différents traitements, on recueille une gomme qui est purifiée par " flash " chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : CH₂Cl₂/MeOH 1%). On isole la **I-202** sous forme d'une gomme (Rdt = 72%) qui cristallise de l'AcOEt en plaquettes incolores. R_f (CH₂Cl₂/MeOH, 9,5 : 0,5) : 0,66. F = 188-190°C. $[\alpha]_D^{20} = +4,1^\circ$ (c 0,98; CHCl₃).

15 RMN ¹H (CDCl₃) δ ppm : 1,99 (s, 3H, NCOCH₃); 3,19-3,28 (m, 2H, NCH₂CH₂S); 3,49 (d, J = 6,1 Hz, 2H, CH₂ cys); 3,52-3,61 (m, 2H, NCH₂CH₂S); 4,63-4,71 (m, 1H, α H cys); 6,56 (d, J = 7,2 Hz, 1H, NH cys); 6,92-7,08 (m, 1H, NHCH₂); 7,38-7,48, 7,52-7,62, 7,88-7,97 (3m, 10H, H aromatiques).

20 SM : (FAB⁺/G-T) m/z 861 (2M+H)⁺, 431 (M+H)⁺.

Analyse : C₂₁H₂₂N₂O₄S₂ (430)

Calc. % : C 58,60 H 5,12 N 6,51

Tr. % : 58,37 5,10 6,51

25 **2.22. N-ISOBUTYRYL-S-TRITYL-L-CYSTEINE (13)**

Ce composé a été synthétisé en adaptant, à la N-isobutyryl-L-cystéine, la méthode de tritylation décrite par K.-Y. Zee-Cheng et C. C. Cheng, *J. Med. Chem.*, 1970, 13, 414-418. Une suspension contenant 30 4,1 g (21,5 mmoles) de N-isobutyryl-L-cystéine [(préparée selon H.

Brückner et coll., *J. Chromatogr.*, 1989, 476, 73-82), ($[\alpha]_D^{20} = +84^\circ$ (c 1; CHCl_3)), 5,6 g (21,5 mmoles) de triphénylméthanol et 16 ml d'acide acétique glacial est agitée à la température ambiante. Tout en maintenant la température à 20-25°C, le mélange est additionné, goutte à goutte, de 4,1 ml (32,2 mmoles) d'éthérate de BF_3 . Après 3 h d'agitation, la solution marron obtenue est ensuite refroidie à 0 °C puis additionnée de 70 ml d'une solution aqueuse d'acétate de sodium et de 140 ml d'eau. A la fin des ajouts, il y a prise en masse du mélange réactionnel sous forme d'un gel. Ce mélange est abandonné une nuit à 0 °C puis est ensuite additionné, sous forte agitation, de 150 ml d'eau glacée et de 120 ml d'éther. La phase étherée est décantée et les eaux résiduelles sont lavées avec 4 x 80 ml d'éther. Les phases organiques sont rassemblées, lavées avec 4 x 60 ml d'eau glacée, séchées sur sulfate de sodium, filtrées et évaporées à sec sous vide. Le produit brut obtenu est purifié par lavages successifs avec de l'hexane (5 x 50 ml) pour fournir **13**, sous forme d'une gomme homogène sur CCM avec un rendement de 81%. R_f ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{AcOH}$, 9,4 : 0,6 : 0,07) : 0,53.

$[\alpha]_D^{20} = +21,4^\circ$ (c 1,12; CHCl_3).

RMN ^1H (CDCl_3) δ ppm : 1,12; 1,14 (2d, $J = 2 \times 6,9$ Hz, $2 \times 3\text{H}$, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$); 2,24-2,42 (m, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$); 2,64-2,28 (m, 2H, CH_2); 4,31-4,43 (m, 1H, α H); 5,67-6,15 (m large, 1H, CO_2H); 5,90 (d, $J = 7,1$ Hz, 1H, NH recouvrant partiellement le m à 5,67-6,15); 7,18-7,33, 7,37-7,46, (2m, 15H, H aromatiques).

SM : ($\text{FAB}^+/\text{G-T}$) m/z 867 ($2\text{M}+\text{H}$) $^+$, 431 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$; ($\text{FAB}^-/\text{G-T}$) m/z 865 ($2\text{M}-\text{H}$) $^-$, 432 ($\text{M}-\text{H}$) $^-$.

Analyse : $\text{C}_{26}\text{H}_{27}\text{NO}_3\text{S}$ (433)

Calc. % :	C 72,06	H 6,24	N 3,23
-----------	---------	--------	--------

Tr. % :	72,24	6,22	3,28
---------	-------	------	------

2.23. N-(N-ISOBUTYRYL-S-TRITYL-L-CYSTEINYL)-S-ACETYLCYSTEAMINE (14)

La réaction de couplage de **13** (3,93 mmoles) avec le chlorhydrate
 5 de S-acétylcystéamine est réalisée selon la méthode B décrite dans la
 première voie de synthèse (exemple 1). Après les différents traitements,
 le composé attendu est isolé par "flash" chromatographie sur colonne
 de gel de silice (éluant : AcOEt/éther de pétrole 60%). On recueille **14**,
 sous forme d'une mousse incolore, avec un rendement de 67%. R_f
 10 (AcOEt/éther de pétrole, 6 : 4) : 0,5. $[\alpha]_D^{20} = +9,3^\circ$ (c 0,97; CHCl₃).

RMN ¹H (CDCl₃) δ ppm : 1,10 (d, J = 6,9 Hz, 6H, C(CH₃)₂); 2,18-2,36
 (m, 1H, CH(CH₃)₂); 2,29 (s, 3H, SCOCH₃ recouvrant partiellement le m
 à 2,18-2,36); 2,50 (dd, J = 5,6; 12,8 Hz, 1H, β H_a cys); 2,72 (dd, J = 6,7;
 12,8 Hz, 1H, β H_b cys); 2,88-3,01 (m, 2H, NCH₂CH₂S); 3,29-3,41 (m,
 15 2H, NCH₂CH₂S); 4,06-4,19 (m, 1H, α H cys); 5,82 (d, J = 7,4 Hz, 1H,
 NH cys); 6,42 (t, J = 5,5 Hz, 1H, NHCH₂); 7,17-7,35, 7,39-7,48 (2m,
 15H, H aromatiques).

SM : (FAB⁺/G-T) m/z 535 (M+H)⁺.

Analyse : C₃₀H₃₄N₂O₃S (534)

20	Calc. % :	C 67,42	H 6,37	N 5,24
	Tr. % :	67,05	6,72	5,30

2.24. N-(N-ISOBUTYRYL-L-CYSTEINYL)-S-ACETYLCYSTEAMINE (I-203)

25 Ce composé est obtenu par la S-détritylation de **14** (2,56 mmoles).
 Le protocole utilisé est le même que celui décrit dans l'exemple 1 pour
 la synthèse de la **I-152**. Après les différents traitements, on recueille
 une gomme qui est purifiée par "flash" chromatographie sur colonne
 de gel de silice (éluant : CH₂Cl₂/éther 30%). On isole la **I-203**, sous

forme d'un solide blanc, avec un rendement de 70%. R_f (CH_2Cl_2 /éther, 5 : 5) : 0,44. $F = 117-120^\circ\text{C}$. $[\alpha]_D^{20} = -36,5^\circ$ (c 1,04; CHCl_3).

RMN ^1H (CDCl_3) δ ppm : 1,19, 1,20 (2d, $J = 2 \times 6,9$ Hz, 2 x 3H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$); 1,62 (dd, $J = 7,5; 10,3$ Hz, 1H, SH); 2,37 (s, 3H, SCOCH_3);
 5 2,47 (hept, $J = 6,9$ Hz, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$); 2,72 (ddd, $J = 6,5; 10,3; 13,9$ Hz, 1H, β Ha cys); 3,00-3,08 (m, 2H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{S}$); 3,06 (ddd, $J = 4,2; 7,5; 13,9$ Hz, 1H, β Hb cys); 3,41-3,53 (m, 2H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{S}$); 4,61 (ddd, $J = 4,2; 6,5; 7,4$ Hz, 1H, α H cys); 6,46 (d, $J = 7,4$ Hz, 1H, NH cys); 6,72-6,85 (m, 1H, NHCH_2).

10 SM : $(\text{FAB}^+/\text{G-T}) m/z 293 (\text{M}+\text{H})^+$.

Analyse : $\text{C}_{11}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}_2$ (292)

Calc. % :	C 45,20	H 6,84	N 9,59
Tr. % :	45,22	7,11	9,69

15 **2.25. *N*-(*N*-ISOBUTYRYL-*S*-ACETYL-*L*-CYSTEINYL)-*S*-ACETYLCYSTEAMINE (I-204)**

La S-acylation de la **I-203** (0,34 mmole), avec de l'anhydride acétique, est réalisée selon la méthode générale décrite dans l'exemple
 20 2. Le mélange réactionnel est ensuite traité suivant le protocole décrit pour la synthèse de la **I-177**. Après les différents traitements, on recueille une gomme qui est purifiée par "flash" chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : CH_2Cl_2 /éther 50%). On isole la **I-204** sous forme semi-cristalline ($R_{dt} = 75\%$) qui, après trituration dans de
 25 l'hexane, fournit une poudre incolore. R_f (CH_2Cl_2 /éther, 2 : 8) : 0,43. $F = 125-127^\circ\text{C}$. $[\alpha]_D^{20} = -22,9^\circ$ (c 1,05; CHCl_3).

RMN ^1H (CDCl_3) δ ppm : 1,16 (d, $J = 6,9$ Hz, 6H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$); 2,34-2,47 (m, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$); 2,36, 2,38 (2s, 2 x 3H, 2 x SCOCH_3 recouvrant partiellement le m à 2,34-2,47); 2,97-3,06 (m, 2H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{S}$); 3,26-

3,32 (m, 2H, CH₂ cys); 3,38-3,48 (m, 2H, NCH₂CH₂S); 4,47-4,58 (m, 1H, α H cys); 6,39 (d, J = 7,3 Hz, 1H, NH cys); 6,80-6,91 (m, 1H, NHCH₂).

SM : (FAB⁺/G-T) *m/z* 669 (2M+H)⁺, 335 (M+H)⁺.

5 Analyse : C₁₃H₂₂N₂O₄S₂ (334)

Calc. % :	C 46,71	H 6,59	N 8,38
-----------	---------	--------	--------

Tr. % :	46,76	6,90	8,35
---------	-------	------	------

2.26. *N-(N,S-Bis-ISOBUTYRYL-L-CYSTEINYL)-S-ACETYLCYSTEAMINE*

10 (**I-205**)

La S-acylation de la **I-203** (0,32 mmole), avec du chlorure d'isobutyryle, est réalisée selon la méthode générale décrite dans l'exemple 2. Le mélange réactionnel est ensuite traité suivant le protocole décrit pour la synthèse de la **I-177**. Après les différents
15 traitements, on recueille une huile qui est purifiée par "flash" chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : AcOEt/éther de pétrole 70%). On isole la **I-205** sous forme d'une gomme incolore (Rdt = 56%). R_f (AcOEt/éther de pétrole, 4 : 6) : 0,20. [α]_D²⁰ = -17,3° (c 1,1; CHCl₃).

20 RMN ¹H (CDCl₃) δ ppm : 1,16 (d, J = 6,9 Hz, 6H, C(CH₃)₂ de N-*i*-but.); 1,20, 1,21 (2d, J = 2 x 6,9 Hz, 2 x 3H, C(CH₃)₂ de S-*i*-but.); 2,33-2,46 (m, 1H, CH(CH₃)₂ de N-*i*-but); 2,36 (s, 3H, SCOCH₃ recouvrant partiellement le m à 2,33-2,46); 2,79 (hept app., J = 6,9 Hz, 1H CH(CH₃)₂ de S-*i*-but); 2,97-3,07 (m, 2H, NCH₂CH₂S); 3,25 (dd, J = 5,0;
25 13,8 Hz, 1H, β Ha cys); 3,32 (dd, J = 7,5; 13,8 Hz, 1H, β Hb cys); 3,38-3,48 (m, 2H, NCH₂CH₂S); 4,45-4,57 (m, 1H, α H cys); 6,44 (d, J = 7,1 Hz, 1H, NH cys); 6,86-6,97 (m, 1H, NHCH₂).

SM : (FAB⁺/G-T) *m/z* 725 (2M+H)⁺, 363 (M+H)⁺.

Analyse : C₁₅H₂₆N₂O₄S₂ (362)

30 Calc. % :	C 49,72	H 7,18	N 7,73
--------------	---------	--------	--------

Tr. % : 49,87 7,36 7,80

2.27. N-(N-ISOBUTYRYL-S-PIVALOYL-L-CYSTEINYL)-S-ACETYLCYSTEAMINE (I-206)

5

La S-acylation de la **I-203** (0,31 mmole), avec du chlorure de pivaloyle, est réalisée selon la méthode générale décrite dans l'exemple 2. Le mélange réactionnel est ensuite traité suivant le protocole décrit pour la synthèse de la **I-177**. Après les différents traitements, on recueille une gomme qui est purifiée par "flash" chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : CH₂Cl₂/éther 50%). On isole la **I-206** sous forme semi-cristalline (Rdt = 60%) qui, après trituration dans de l'hexane, fournit une poudre incolore. R_f (AcOEt/éther de pétrole, 4 : 6) : 0,3. F = 101-103°C. $[\alpha]_D^{20} = -19,3^\circ$ (c 1,09; CHCl₃).

15 RMN ¹H (CDCl₃) δ ppm : 1,15 (d, J = 6,9 Hz, 6H, C(CH₃)₂); 1,24 (s, 9H, C(CH₃)₃); 2,30-2,45 (m, 1H, CH(CH₃)₂); 2,36 (s, 3H, SCOCH₃ recouvrant partiellement le m à 2,30-2,45); 2,96-3,07 (m, 2H, NCH₂CH₂S); 3,23 (dd, J = 5,3; 13,8 Hz, 1H, β Ha cys); 3,30 (dd, J = 6,9; 13,8 Hz, 1H, β Hb cys); 3,37-3,49 (m, 2H, NCH₂CH₂S); 4,44-4,57 (m, 20 1H, α H cys); 6,44 (d, J = 7,1 Hz, 1H, NH cys); 6,85-6,98 (m, 1H, NHCH₂).

SM : (FAB⁺/G-T) m/z 753 (2M+H)⁺, 377 (M+H)⁺.

Analyse : C₁₆H₂₈N₂O₄S₂ (376)

Calc. % : C 51,06 H 7,45 N 7,45
25 Tr. % : 50,98 7,72 7,54

2.28. N-(N-ISOBUTYRYL-S-BENZOYL-L-CYSTEINYL)-S-ACETYLCYSTEAMINE (I-207)

La S-acylation de la **I-203** (0,31 mmole), avec du chlorure de benzoyle, est réalisée selon la méthode générale décrite dans l'exemple 30

2. Le mélange réactionnel est ensuite traité suivant le protocole décrit pour la synthèse de la **I-177**. Après les différents traitements, on recueille une gomme qui est purifiée par "flash" chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : AcOEt/éther de pétrole 75%). On isole
 5 la **I-207** sous forme d'un solide incolore (Rdt = 55%) qui cristallise de l'éther en microcristaux incolores. R_f (CH₂Cl₂/éther, 7,5 : 2,5) : 0,45. $F = 135-137^\circ\text{C}$. $[\alpha]_D^{20} = +3,5^\circ$ (c 1,16; CHCl₃).

RMN ¹H (CDCl₃) δ ppm : 1,12, 1,14 (2d, $J = 2 \times 6,9$ Hz, 2 x 3H, C(CH₃)₂); 2,30-2,47 (m, 1H, CH(CH₃)₂); 2,33 (s, 3H, SCOCH₃
 10 recouvrant partiellement le m à 2,30-2,47); 2,98-3,07 (m, 2H, NCH₂CH₂S); 3,40-3,58 (m, 4H, CH₂ cys, NCH₂CH₂S); 4,59-4,70 (m, 1H, α H cys); 6,59 (d, $J = 7,1$ Hz, 1H, NH cys); 6,93-7,04 (m, 1H, NHCH₂); 7,41-7,53, 7,57-7,61, 7,92-8,01 (3m, 5H, H aromatiques).

SM : (FAB⁺/G-T) m/z 793 (2M+H)⁺, 397 (M+H)⁺.

15 Analyse : C₁₈H₂₄N₂O₄S₂ (396)

Calc. % :	C 54,54	H 6,06	N 7,07
Tr. % :	54,51	6,20	7,07

2.29. N-(N-ISOBUTYRYL-S-TRITYL-L-CYSTEINYL)-S- 20 ISOBUTYRYLCYSTEAMINE (15)

La réaction de couplage de **13** (3,93 mmoles) avec le chlorhydrate de S-isobutyrylcystéamine est réalisée selon la méthode B décrite dans la première voie de synthèse (exemple 1). Après les différents
 25 traitements, le composé attendu est isolé par "flash" chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : AcOEt/éther de pétrole 65%). On recueille **15**, sous forme d'une mousse incolore, avec un rendement de 75%. R_f (AcOEt/éther de pétrole, 5 : 5) : 0,6. $[\alpha]_D^{20} = +7,9^\circ$ (c 1,27; CHCl₃).

RMN ^1H (CDCl_3) δ ppm : 1,107; 1,110; 1,159; 1,162 (4d, $J = 4 \times 6,9$ Hz, $4 \times 3\text{H}$, $2 \times \text{C}(\text{CH}_3)_2$); 2,17-2,32 (m, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ de N-*i*-but.); 2,51 (dd, $J = 5,7$; 12,8 Hz, 1H, β Ha cys); 2,63-2,79 (m, 1H $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ de S-*i*-but.); 2,72(dd, $J = 6,8$; 12,8 Hz, 1H, β Hb cys recouvrant partiellement le m à 2,63-2,79); (2,88-2,98 (m, 2H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{S}$); 3,29-3,40 (m, 2H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{S}$); 4,07-4,19 (m, 1H, α H cys); 5,81 (d, $J = 7,3$ Hz, 1H, NH cys); 6,32-6,43 (m, 1H, NHCH_2); 7,18-7,35, 7,39-7,47 (2m, 15H, H aromatiques).

SM : $(\text{FAB}^+/\text{G-T}) m/z 563 (\text{M}+\text{H})^+$.

10 Analyse : $\text{C}_{32}\text{H}_{38}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}_2$ (562)

Calc. % : C 68,33 H 6,76 N 4,98

Tr. % : 68,27 6,71 4,88

2.30. *N*-(*N*-ISOBUTYRYL-*L*-CYSTEINYL)-*S*-ISOBUTYRYLCYSTEAMINE

15 (**I-208**)

Ce composé est obtenu par la S-détritylation de **15** (2,75 mmoles). Le protocole utilisé est le même que celui décrit dans l'exemple 1 pour la synthèse de la **I-152**. Après les différents traitements, on recueille une gomme qui est purifiée par "flash" chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : CH_2Cl_2 /éther 25%). On isole la **I-208** sous forme d'une gomme qui, après trituration dans de l'hexane, fournit une poudre incolore (Rdt = 69%). R_f (CH_2Cl_2 /éther, 5 : 5) : 0,39. $F = 125$ - 127°C . $[\alpha]_D^{20} = -25,7^\circ$ (c 1,05; CHCl_3).

RMN ^1H (CDCl_3) δ ppm : 1,19, 1,20 (2d, $J = 2 \times 6,9$ Hz, $2 \times 6\text{H}$, $2 \times \text{C}(\text{CH}_3)_2$); 1,62 (dd, $J = 7,5$; 10,3 Hz, 1H, SH); (2,41-2,54 (m, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ de N-*i*-but.); 2,70-2,84 (m, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ de S-*i*-but.); 2,72(ddd, $J = 6,5$; 10,3; 13,7 Hz, 1H, β Ha cys recouvrant partiellement le m à 2,70-2,84); 2,98-3,14 (m, 3H, β Hb cys, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{S}$); 3,42-3,53

(m, 2H, NCH₂CH₂S); 4,54-4,66 (m, 1H, α H cys); 5,81 (d, J = 7,4 Hz, 1H, NH cys); 6,74-6,85 (m, 1H, NHCH₂).

SM : (FAB⁺/G-T) m/z 641 (2M+H)⁺, 321 (M+H)⁺.

Analyse : C₁₃H₂₄N₂O₃S₂ (320)

5	Calc. % :	C 48,75	H 7,50	N 8,75
	Tr. % :	48,45	7,82	8,75

2.31. N-(N-ISOBUTYRYL-S-ACETYL-L-CYSTEINYL)-S-ISOBUTYRYLCYSTEAMINE (I-209)

10

La S-acylation de la **I-208** (0,28 mmole), avec de l'anhydride acétique, est réalisée selon la méthode générale décrite dans l'exemple 2. Le mélange réactionnel est ensuite traité suivant le protocole décrit pour la synthèse de la **I-177**. Après les différents traitements on recueille une gomme qui, après triturations dans de l'hexane, fournit une poudre incolore homogène sur CCM avec un rendement de 80%. R_f (CH₂Cl₂/éther, 5 : 5) : 0,55. F = 100-102°C. $[\alpha]_D^{20} = -22,9^\circ$ (c 0,92; CHCl₃).

RMN ¹H (CDCl₃) δ ppm : 1,15, 1,20 (2d, J = 2 x 6,9 Hz, 2 x 6H, 2 x C(CH₃)₂); (2,34-2,47 (m, 1H, CH(CH₃)₂ de N-*i*-but.); 2,37 (s, 3H, SCOCH₃ recouvrant partiellement le m à 2,34-2,47); 2,69-2,82 (m, 1H, CH(CH₃)₂ de S-*i*-but.); 2,95-3,05 (m, 2H, NCH₂CH₂S); 3,26-3,32 (m, 2H, CH₂ cys); 3,37-3,47 (m, 2H, NCH₂CH₂S); 4,47-4,59 (m, 1H, α H cys); 6,39 (d, J = 7,1 Hz, 1H, NH cys); 6,79-6,90 (m, 1H, NHCH₂).

25 SM : (FAB⁺/G-T) m/z 725 (2M+H)⁺, 363 (M+H)⁺.

Analyse : C₁₅H₂₆N₂O₄S₂ (362)

	Calc. % :	C 49,72	H 7,18	N 7,73
	Tr. % :	49,47	7,41	7,70

2.31. N-(N,S-BIS-ISOBUTYRYL-L-CYSTEINYL)-S-ISOBUTYRYLCYSTEAMINE (I-210)

La S-acylation de la **I-208** (0,28 mmole), avec du chlorure d'isobutyryle, est réalisée selon la méthode générale décrite dans l'exemple 2. Le mélange réactionnel est ensuite traité suivant le protocole décrit pour la synthèse de la **I-177**. Après les différents traitements, on recueille une gomme qui est purifiée par "flash" chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : CH₂Cl₂/éther 25%). On isole la **I-210** sous forme d'une gomme qui, après trituration dans de l'hexane, fournit une poudre incolore (Rdt = 63%). R_f (CH₂Cl₂/éther, 5 : 5) : 0,68. F = 94-96°C. $[\alpha]_D^{20} = -11^\circ$ (c 0,91; CHCl₃). RMN ¹H (CDCl₃) δ ppm : 1,154, 1,158, 1,199, 1,202 (4d, J = 4 x 6,9 Hz, 2 x 3H, 2 x 6H, 3 x C(CH₃)₂); (2,32-2,46 (m, 1H, CH(CH₃)₂ de N-i-but.); 2,69-2,86 (m, 2H, 2 x CH(CH₃)₂ de 2 x S-i-but); 2,93-3,07 (m, 2H, NCH₂CH₂S); 3,25 (dd, J = 5,0; 14,5 Hz, 1H, β Ha cys); 3,32 (dd, J = 7,7; 14,5 Hz, 1H, β Hb cys); 3,38-3,47 (m, 2H, NCH₂CH₂S); 4,45-4,56 (m, 1H, α H cys); 6,42 (d, J = 7,4 Hz, 1H, NH cys); 6,82-6,92 (m, 1H, NHCH₂).

SM : (FAB⁺/G-T) m/z 781 (2M+H)⁺, 391 (M+H)⁺.

Analyse : C₁₇H₃₀N₂O₄S₂ (390)

Calc. % :	C 52,31	H 7,69	N 7,18
Tr. % :	52,02	8,02	7,21

2.32. N-(N-ISOBUTYRYL-S-BENZOYL-L-CYSTEINYL)-S-ISOBUTYRYLCYSTEAMINE (I-211)

La S-acylation de la **I-208** (0,29 mmole), avec du chlorure de benzoyle, est réalisée selon la méthode générale décrite dans l'exemple 2. Le mélange réactionnel est ensuite traité suivant le protocole décrit

pour la synthèse de la **I-177**. Après les différents traitements, on recueille une gomme qui est purifiée par "flash" chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : CH₂Cl₂/éther 35%). On isole la **I-210** sous forme d'une gomme qui, après trituration dans de l'éther de pétrole, fournit une poudre incolore (Rdt = 86%). R_f (CH₂Cl₂/éther, 6 : 4) : 0,52. F = 155-157°C. $[\alpha]_D^{20} = +7,0^\circ$ (c 1; CHCl₃).

RMN ¹H (CDCl₃) δ ppm : 1,12, 1,15, 1,18, (3d, J = 3 x 6,9 Hz, 2 x 3H, 1 x 6H, 2 x C(CH₃)₂); (2,36-2,46 (m, 1H, CH(CH₃)₂ de N-i-but.); 2,68-2,80 (m, 1H, CH(CH₃)₂ de S-i-but); 2,95-3,05 (m, 2H, NCH₂CH₂S); 3,40-3,62 (m, 4H, CH₂ cys, NCH₂CH₂S); 4,56-4,69 (m, 1H, α H cys); 6,54 (d, J = 7,0 Hz, 1H, NH cys); 6,84-6,95 (m, 1H, NHCH₂); 7,42-7,51, 7,57-7,65, 7,94-8,01 (m, 5H, H aromatiques).

SM : (FAB⁺/G-T) m/z 849 (2M+H)⁺, 425 (M+H)⁺.

Analyse : C₂₀H₂₈N₂O₄S₂ (424)

15	Calc. % :	C 56,60	H 6,60	N 6,60
	Tr. % :	56,42	6,79	6,63

2.33. N/(N-ISOBUTYRYL-S-TRITYL-L-CYSTEINYL)-S-PIVALOYL-CYSTEAMINE (16)

20

La réaction de couplage de **13** (3,93 mmoles) avec le chlorhydrate de S-pivaloylcystéamine est réalisée selon la méthode B décrite dans la première voie de synthèse (exemple 1). Après les différents traitements, le composé attendu est isolé par "flash" chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : AcOEt/éther de pétrole 70%). On recueille **16** sous forme d'une mousse qui, après trituration dans de l'hexane, fournit une poudre incolore (Rdt = 88%). R_f (CH₂Cl₂/éther, 6 : 4) : 0,82. F = 85-88°C. $[\alpha]_D^{20} = +5,9^\circ$ (c 1,02; CHCl₃).

RMN ¹H (CDCl₃) δ ppm : 1,11 (d, J = 6,9 Hz, 6H, C(CH₃)₂); 1,21 (s, 9H, C(CH₃)₃); 2,20-2,38 (m, 1H, CH(CH₃)₂); 2,51 (dd, J = 5,6; 12,9 Hz, 1H,

30

β Ha cys); 2,72(dd, $J = 6,7$; 12,9 Hz, 1H, β Hb cys); 2,84-2,96 (m, 2H, NCH₂CH₂S); 3,27-3,39 (m, 2H, NCH₂CH₂S); 4,03-4,17 (m, 1H, α H cys); 5,78 (d, $J = 7,4$ Hz, 1H, NH cys); 6,22-6,34 (m, 1H, NHCH₂); 7,18-7,35, 7,38-7,48 (2m, 15H, H aromatiques).

5 SM : (FAB⁺/G-T) m/z 577 (M+H)⁺.

Analyse : C₃₃H₄₀N₂O₃S₂ (576)

Calc. % :	C 68,75	H 6,94	N 4,86
Tr. % :	68,49	6,98	4,93

10 **2.34. N-(N-ISOBUTYRYL -L-CYSTEINYL)-S-PIVALOYL-CYSTEAMINE (I-214)**

Ce composé est obtenu par la S-détritylation de **16** (2,78 mmoles). Le protocole utilisé est le même que celui décrit dans l'exemple 1 pour la synthèse de la **I-152**. Après les différents traitements, on recueille une gomme qui est purifiée par "flash" chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : CH₂Cl₂/éther 22%). On isole la **I-214** sous forme d'une gomme qui, après trituration dans de l'hexane, fournit une poudre incolore (Rdt = 70%). R_f (CH₂Cl₂/éther, 5 : 5) : 0,46. F = 120-122°C. $[\alpha]_D^{20} = -25^\circ$ (c 1,04; CHCl₃).

20 RMN ¹H (CDCl₃) δ ppm : 1,194, 1,198 (2d, $J = 2 \times 6,9$ Hz, 2 x 3H, C(CH₃)₂); 1,23 (s, 9H, C(CH₃)₃); 1,61 (dd, $J = 7,6$; 10,2 Hz, 1H, SH); 2,47 (hept app., $J = 6,9$ Hz, 1H, CH(CH₃)₂); 2,72(ddd, $J = 6,5$; 10,2; 13,8 Hz, 1H, β Ha cys); 2,95-3,13 (m, 3H, β Hb cys, NCH₂CH₂S); 3,40-3,52 (m, 2H, NCH₂CH₂S); 4,54-4,66 (m, 1H, α H cys); 6,49 (d, $J = 7,5$ Hz, 1H, NH cys); 6,73-6,88 (m, 1H, NHCH₂).

25 SM : (FAB⁺/G-T) m/z 669 (2M+H)⁺, 335 (M+H)⁺.

Analyse : C₁₄H₂₆N₂O₃S₂ (334)

Calc. % :	C 50,30	H 7,78	N 8,38
Tr. % :	50,19	7,92	8,35

2.35. N-(N-ISOBUTYRYL-S-ACETYL-L-CYSTEINYL)-S-PIVALOYL-CYSTEAMINE (I-215)

La S-acylation de la **I-214** (0,27 mmole), avec de l'anhydride
 5 acétique, est réalisée selon la méthode générale décrite dans l'exemple
 2. Le mélange réactionnel est ensuite traité suivant le protocole décrit
 pour la synthèse de la **I-177**. Après les différents traitements on
 recueille une gomme qui, après triturations dans de l'hexane, fournit
 une poudre incolore homogène sur CCM avec un rendement de 80%. R_f
 10 (CH₂Cl₂/éther, 6 : 4) : 0,45. F = 112-114°C. $[\alpha]_D^{20} = -18,8^\circ$ (c 0,9;
 CHCl₃).

RMN ¹H (CDCl₃) δ ppm : 1,16 (d, J = 6,9 Hz, 6H, C(CH₃)₂); 1,24 (s, 9H,
 C(CH₃)₃); (2,31-2,49 (m, 1H, CH(CH₃)₂); 2,37 (s, 3H, SCOCH₃
 recouvrant partiellement le m à 2,31-2,49); 2,88-3,08 (m, 2H,
 15 NCH₂CH₂S); 3,25-3,34 (m, 2H, CH₂ cys); 3,35-3,47 (m, 2H,
 NCH₂CH₂S); 4,48-4,60 (m, 1H, α H cys); 6,38 (d, J = 7,3 Hz, 1H, NH
 cys); 6,74-6,89 (m, 1H, NHCH₂).

SM : (FAB⁺/G-T) m/z 377 (M+H)⁺.

Analyse : C₁₅H₂₈N₂O₄S₂ (376)

20	Calc. % :	C 51,06	H 7,45	N 7,45
	Tr. % :	50,97	7,81	7,47

2.36. N-(N,S-BIS-ISOBUTYRYL-L-CYSTEINYL)-S-PIVALOYL-CYSTEAMINE (I-216)

25 La S-acylation de la **I-214** (0,26 mmole), avec du chlorure
 d'isobutyryle, est réalisée selon la méthode générale décrite dans
 l'exemple 2. Le mélange réactionnel est ensuite traité suivant le
 protocole décrit pour la synthèse de la **I-177**. Après les différents
 traitements, on recueille une gomme qui est purifiée par "flash"
 30 chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : CH₂Cl₂/éther
 15%). On isole la **I-216** sous forme d'une gomme qui, après trituration

dans de l'hexane, fournit une poudre incolore (Rdt = 78%). R_f (CH₂Cl₂/éther, 6 : 4) : 0,61. F = 105-107°C. $[\alpha]_D^{20} = -12,2^\circ$ (c 1,07; CHCl₃).

RMN ¹H (CDCl₃) δ ppm : 1,154, 1,157, 1,196, 1,201 (4d, J = 4 x 6,9 Hz, 4 x 3H, 2 x C(CH₃)₂); 1,24 (s, 9H, C(CH₃)₃); 2,39 (hept app., J = 6,9 Hz, 1H, CH(CH₃)₂ de N-*i*-but); 2,79 (hept app., J = 6,9 Hz, 1H, CH(CH₃)₂ de S-*i*-but); 2,87-3,08 (m, 2H, NCH₂CH₂S); 3,25 (dd, J = 5,2; 14,5 Hz, 1H, β *Ha* cys); 3,32 (dd, J = 7,5, 14,5 Hz, 1H, β *Hb* cys); 3,37-3,47 (m, 2H, NCH₂CH₂S); 4,46-4,59 (m, 1H, α *H* cys); 6,43 (d, J = 7,0 Hz, 1H, NH cys); 6,81-6,93 (m, 1H, NHCH₂).

SM : (FAB⁺/G-T) *m/z* 809 (2M+H)⁺, 405 (M+H)⁺.

Analyse : C₁₈H₃₂N₂O₄S₂ (404)

Calc. % :	C 53,47	H 7,92	N 6,93
-----------	---------	--------	--------

Tr. % :	53,33	8,09	6,95
---------	-------	------	------

15

2.37. N-(N-ISOBUTYRYL-S-PIVALOYL-L-CYSTEINYL)-S-

PIVALOYL-CYSTEAMINE (I-217)

La S-acylation de la **I-214** (0,26 mmole), avec du chlorure de pivaloyle, est réalisée selon la méthode générale décrite dans l'exemple 2. Le mélange réactionnel est ensuite traité suivant le protocole décrit pour la synthèse de la **I-177**. Après les différents traitements on recueille une gomme qui, après triturations dans de l'hexane, fournit une poudre incolore homogène sur CCM avec un rendement de 55%. R_f (CH₂Cl₂/éther, 6 : 4) : 0,63. F = 106-108°C. $[\alpha]_D^{20} = -10,2^\circ$ (c 1,18; CHCl₃).

25

RMN ¹H (CDCl₃) δ ppm : 1,151, 1,157, (2d, J = 2 x 6,9 Hz, 2 x 3H, C(CH₃)₂); 1,240, 1,244 (2s, 2 x 9H, 2 x C(CH₃)₃); 2,38 (hept app., J = 6,9 Hz, 1H, CH(CH₃)₂); 2,86-3,07 (m, 2H, NCH₂CH₂S); 3,24 (dd, J =

5,0; 14,2 Hz, 1H, β Ha cys); 3,30 (dd, $J = 6,5, 14,2$ Hz, 1H, β Hb cys); 3,33-3,48 (m, 2H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{S}$); 4,42-4,54 (m, 1H, α H cys); 6,39 (d, $J = 7,0$ Hz, 1H, NH cys); 6,74-6,86 (m, 1H, NHCH_2).

SM : (FAB⁺/G-T) m/z 837 (2M+H)⁺, 419 (M+H)⁺.

5 Analyse : $\text{C}_{19}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}_2$ (418)

Calc. % :	C 54,81	H 8,17	N 6,73
-----------	---------	--------	--------

Tr. % :	54,50	8,27	6,74
---------	-------	------	------

2.38. *N-(N-ISOBUTYRYL-S-BENZOYL-L-CYSTEINYL)-S-*

10 *PIVALOYL-CYSTEAMINE (I-218)*

La S-acylation de la **I-214** (0,26 mmole), avec du chlorure de benzoyle, est réalisée selon la méthode générale décrite dans l'exemple 2. Le mélange réactionnel est ensuite traité suivant le protocole décrit
15 pour la synthèse de la **I-177**. Après les différents traitements, on recueille une gomme qui est purifiée par "flash" chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : CH_2Cl_2 /éther 25%). On isole la **I-218** sous forme d'une gomme qui, après trituration dans de l'hexane, fournit une poudre incolore (Rdt = 73%). R_f (CH_2Cl_2 /éther, 5 : 5) : 0,57. F =
20 123-124°C. $[\alpha]_D^{20} = +8,7^\circ$ (c 0,92; CHCl_3).

RMN ^1H (CDCl_3) δ ppm : 1,12, 1,14, (2d, $J = 2 \times 6,9$ Hz, 2 x 3H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$); 1,22 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 2,40 (hept app., $J = 6,9$ Hz, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$); 2,89-3,09 (m, 2H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{S}$); 3,37-3,61 (m, 4H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{S}$, CH_2 cys); 4,57-4,70 (m, 1H, α H cys); 6,55 (d, $J = 7,3$ Hz,
25 1H, NH cys); 6,84-6,94 (m, 1H, NHCH_2); 7,41-7,52, 7,55-7,66, 7,92-8,01 (3m, 5H, H aromatiques).

SM : (FAB⁺/G-T) m/z 877 (2M+H)⁺, 439 (M+H)⁺.

Analyse : $\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}_2$ (438)

Calc. % :	C 57,53	H 6,85	N 6,39
-----------	---------	--------	--------

30 Tr. % :	57,53	6,89	6,37
------------	-------	------	------

2.39. N-(N-ISOBUTYRYL-S-TRITYL-L-CYSTEINYL)-S-BENZOYLCYSTEAMINE (17)

La réaction de couplage de **13** (3,93 mmoles) avec le chlorhydrate
 5 de S-benzoylcystéamine est réalisée selon la méthode B décrite dans la
 première voie de synthèse (exemple 1). Après les différents traitements,
 le composé attendu est isolé par "flash" chromatographie sur colonne de
 gel de silice (éluant : AcOEt/éther de pétrole 70%). On recueille **17** sous
 forme d'une mousse qui, après trituration dans de l'hexane, fournit une
 10 mousse incolore (Rdt = 77%). R_f (CH₂Cl₂/éther, 6 : 4) : 0,76. $[\alpha]_D^{20} =$
 $+7,8^\circ$ (c 1,03; CHCl₃).

RMN ¹H (CDCl₃) δ ppm : 1,09 (d, J = 6,9 Hz, 6H, C(CH₃)₂); 2,18-2,31
 (m, 1H, CH(CH₃)₂); 2,51 (dd, J = 5,6; 12,9 Hz, 1H, β Ha cys); 2,74 (dd, J
 = 6,7, 12,9 Hz, 1H, β Hb cys); 3,07-3,25 (m, 2H, NCH₂CH₂S); 3,40-3,51
 15 (m, 2H, NCH₂CH₂S); 4,07-4,19 (m, 1H, α H cys); 5,74 (d, J = 7,6 Hz,
 1H, NH cys); 6,35-6,45 (m, 1H, NHCH₂); 7,17-7,33, 7,38-7,47, 7,53-
 7,62, 7,89-7,96 (4m, 20H, H aromatiques).

SM : (FAB⁺/G-T) m/z 597 (M+H)⁺.

Analyse : C₃₅H₃₆N₂O₃S₂ (596)

20	Calc. % :	C 70,47	H 6,04	N 4,70
	Tr. % :	70,14	6,10	4,79

2.40. N-(N-ISOBUTYRYL-L-CYSTEINYL)-S-BENZOYLCYSTEAMINE (I-219)

25

Ce composé est obtenu par la S-détritylation de **17** (2,68 mmoles).
 Le protocole utilisé est le même que celui décrit dans l'exemple 1 pour
 la synthèse de la **I-152**. Après les différents traitements, on recueille
 une gomme qui est purifiée par "flash" chromatographie sur colonne
 30 de gel de silice (éluant : CH₂Cl₂/éther 25%). On isole la **I-219** sous

forme d'une gomme qui, après trituration dans de l'hexane, fournit une poudre incolore (Rdt = 58%). R_f (CH_2Cl_2 /éther, 6 : 4) : 0,35. $F = 127$ - 130°C . $[\alpha]_D^{20} = -20,8^\circ$ (c 1,06; CHCl_3).

RMN ^1H (CDCl_3) δ ppm : 1,17, 1,18, (2d, $J = 2 \times 6,9$ Hz, $2 \times 3\text{H}$, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$); 1,59 (dd, $J = 7,5$; 10,3 Hz, 1H, SH) ; 2,44 (hept app., $J = 6,9$ Hz, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$) ; 2,70 (ddd, $J = 6,5$, 10,3, 13,8 Hz, 1H, β Ha cys); 3,07 (ddd, $J = 4,2$, 7,5, 13,8 Hz, 1H, β Hb cys); 3,17-3,34 (m, 2H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{S}$); 3,53-3,64 (m, 2H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{S}$); 4,62 (ddd, $J = 4,2$, 6,5, 8,0 Hz, 1H, α H cys); 6,47 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H, NH cys); 6,80-6,91 (m, 1H, NHCH₂); 7,42-7,53, 7,56-7,65, 7,92-8,01 (3m, 5H, H aromatiques).

SM : ($\text{FAB}^+/\text{G-T}$) m/z 709 ($2\text{M}+\text{H}$)⁺, 355 ($\text{M}+\text{H}$)⁺.

Analyse : $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}_2$ (354)

Calc. % :	C 54,23	H 6,21	N 7,91
Tr. % :	54,20	6,18	7,94

15

2.41. *N*-(*N*-ISOBUTYRYL-*S*-ACETYL-*L*-CYSTEINYL)-*S*-BENZOYLCYSTEAMINE (I-220)

La S-acylation de la **I-219** (0,25 mmole), avec de l'anhydride acétique, est réalisée selon la méthode générale décrite dans l'exemple 2. Le mélange réactionnel est ensuite traité suivant le protocole décrit pour la synthèse de la **I-177**. Après les différents traitements, on recueille une gomme qui est purifiée par "flash" chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : CH_2Cl_2 /éther 15%). On isole la **I-220** sous forme d'une gomme qui, après trituration dans de l'hexane, fournit une poudre incolore (Rdt = 70%). R_f (CH_2Cl_2 /éther, 7,5 : 2,5) : 0,43. $F = 174$ - 176°C . $[\alpha]_D^{20} = -17,6^\circ$ (c 0,91; CHCl_3).

25

RMN ^1H (CDCl_3) δ ppm : 1,13, 1,14, (2d, $J = 2 \times 6,9$ Hz, $2 \times 3\text{H}$, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$); 2,29-2,45 (m, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$); 2,32 (s, 3H, SCOCH_3)

recouvrant partiellement le m à 2,29-2,45); 3,18-3,38 (m, 4H, NCH₂CH₂S, CH₂ cys); 3,45-3,62 (m, 2H, NCH₂CH₂S); 4,50-4,62 (m, 1H, α H cys); 6,39 (d, J = 7,1 Hz, 1H, NH cys); 6,88-6,98 (m, 1H, NHCH₂); 7,42-7,52, 7,55-7,64, 7,92-8,01 (3m, 5H, H aromatiques).

5 SM : (FAB⁺/G-T) m/z 793 (2M+H)⁺, 397 (M+H)⁺.

Analyse : C₁₈H₂₄N₂O₄S₂ (396)

Calc. % :	C 54,54	H 6,06	N 7,07
Tr. % :	54,46	6,02	7,08

10 **2.42. N/(N,S-BIS-ISOBUTYRYL-L-CYSTEINYL)-S-BENZOYLCYSTEAMINE (I-221)**

La S-acylation de la **I-219** (0,25 mmole), avec du chlorure d'isobutyryle, est réalisée selon la méthode générale décrite dans
 15 l'exemple 2. Le mélange réactionnel est ensuite traité suivant le protocole décrit pour la synthèse de la I-177. Après les différents traitements on recueille une gomme qui, après triturations dans de l'hexane, fournit une poudre incolore homogène sur CCM avec un rendement de 86%. R_f (CH₂Cl₂/éther, 7,5 : 2,5) : 0,42. F = 141-143°C.

20 $[\alpha]_D^{20} = -9^\circ$ (c 1,11; CHCl₃).

RMN ¹H (CDCl₃) δ ppm : 1,13, 1,14 (2d, J = 2 x 6,9 Hz, 2 x 3H, C(CH₃)₂ de N-*i*-but.); 1,18 (d, J = 6,9 Hz, 6H, C(CH₃)₂ de S-*i*-but.); 2,37 (hept app., J = 6,9 Hz, 1H, CH(CH₃)₂ de N-*i*-but); 2,75 (hept app., J = 6,9 Hz, 1H, CH(CH₃)₂ de S-*i*-but); 3,16-3,38 (m, 4H, CH₂ cys, NCH₂CH₂S); 3,42-3,64 (m, 2H, NCH₂CH₂S); 4,47-4,58 (m, 1H, α H cys); 6,42 (d, J = 7,0 Hz, 1H, NH cys); 6,87-7,01 (m, 1H, NHCH₂); 7,41-7,50, 7,55-7,63, 7,93-8,01 (3m, 5H, H aromatiques).

SM : (FAB⁺/G-T) m/z 849 (2M+H)⁺, 425 (M+H)⁺.

Analyse : C₂₀H₂₈N₂O₄S₂ (424)

Calc. % :	C 56,60	H 6,60	N 6,60
Tr. % :	56,67	6,62	6,63

2.43. *N*-(*N*-ISOBUTYRYL-S-PIVALOYL-L-CYSTEINYL)-S-

5 *BENZOYLCYSTEAMINE* (**I-222**)

La S-acylation de la **I-219** (0,25 mmole), avec du chlorure de pivaloyle, est réalisée selon la méthode générale décrite dans l'exemple 2. Le mélange réactionnel est ensuite traité suivant le protocole décrit
 10 pour la synthèse de la **I-177**. Après les différents traitements, on recueille une gomme qui est purifiée par "flash" chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : CH₂Cl₂/éther 20%). On isole la **I-222** sous forme d'une gomme (Rdt = 50%) qui, après trituration dans de l'hexane, fournit une poudre incolore. R_f (CH₂Cl₂/éther, 5 : 5) : 0,55. F
 15 = 112-114°C. [α]_D²⁰ = +4,6° (c 1,08; CHCl₃).

RMN ¹H (CDCl₃) δ ppm : 1,12, 1,13 (2d, J = 2 x 6,9 Hz, 2 x 3H, C(CH₃)₂); 1,22 (s, 9H, C(CH₃)₃); 2,36 (hept app., J = 6,9 Hz, 1H, CH(CH₃)₂); 3,18-3,36 (m, 4H, CH₂ cys, NCH₂CH₂S); 3,45-3,62 (m, 2H, NCH₂CH₂S); 4,48-4,60 (m, 1H, α H cys); 6,48 (d, J = 7,2 Hz, 1H, NH
 20 cys); 6,96-7,08 (m, 1H, NHCH₂); 7,40-7,51, 7,54-7,63, 7,92-8,01 (3m, 5H, H aromatiques).

SM : (FAB⁺/G-T) m/z 877 (2M+H)⁺, 439 (M+H)⁺.

Analyse : C₂₁H₃₀N₂O₄S₂ (438)

Calc. % :	C 57,53	H 6,85	N 6,39
25 Tr. % :	57,31	6,86	6,34

2.44. *N*-(*N*-ISOBUTYRYL-S-BENZOYL-L-CYSTEINYL)-S-

BENZOYLCYSTEAMINE (**I-223**)

30 La S-acylation de la **I-219** (0,26 mmole), avec du chlorure de benzoyle, est réalisée selon la méthode générale décrite dans l'exemple

2. Le mélange réactionnel est ensuite traité suivant le protocole décrit pour la synthèse de la I-177. Après les différents traitements, on recueille une gomme qui est purifiée par "flash" chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : CH₂Cl₂/éther 20%). On isole la **I-223** sous forme d'une gomme (Rdt = 84%) qui, après trituration dans de l'hexane, fournit une poudre incolore. R_f (CH₂Cl₂/éther, 7 : 3) : 0,41. F = 154-156°C. $[\alpha]_D^{20} = +7,6^\circ$ (c 0,92; CHCl₃).

RMN ¹H (CDCl₃) δ ppm : 1,10, 1,11 (2d, J = 2 x 6,9 Hz, 2 x 3H, C(CH₃)₂); 2,38 (hept app., J = 6,9 Hz, 1H, CH(CH₃)₂); 3,19-3,28 (m, 2H, NCH₂CH₂S); 3,43-3,64 (m, 4H, CH₂ cys, NCH₂CH₂S); 4,58-4,71 (m, 1H, α H cys); 6,55 (d, J = 7,2 Hz, 1H, NH cys); 6,92-7,01 (m, 1H, NHCH₂); 7,39-7,50, 7,53-7,64, 7,91-7,99 (3m, 10H, H aromatiques).

SM : (FAB⁺/G-T) m/z 917 (2M+H)⁺, 459 (M+H)⁺.

Analyse : C₂₃H₂₆N₂O₄S₂ (458)

15	Calc. % :	C 60,26	H 5,68	N 6,11
	Tr. % :	60,22	5,67	6,00

2.45. N-(N-ACETYL-S-TRITYL-L-CYSTEINYL)THIAZOLIDINE (18)

20

La réaction de couplage de **7** (2 mmoles) avec la thiazolidine est réalisée selon la méthode A décrite dans la première voie de synthèse (exemple 1). Après retour à la température ambiante, l'agitation est poursuivie 12 h. Le milieu réactionnel est alors dilué avec 50 ml d'AcOEt puis lavé (eau, 70 ml; bicarbonate de sodium saturé et glacé, 50 ml; eau, 2 x 50 ml), séché sur sulfate de sodium et évaporé à sec sous vide. La mousse incolore obtenue est ensuite purifiée par "flash" chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : AcOEt/éther de pétrole 30%). On isole **18**, sous forme d'une gomme incolore, avec un rendement de 80%. R_f (AcOEt/éther de pétrole, 8 : 2) :

30

0,40. Cristallise du MeOH en aiguilles incolores. $F = 197-198^{\circ}\text{C}$. $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +0,86^{\circ}$ (c 1,16; CHCl_3).

RMN ^1H (CDCl_3) δ ppm (mélange isomérique, 5,2 : 4,8): 1,95 (s, 3H, NCOCH_3); 2,48-2,66 (m, 2H, CH_2 cys); 2,88-3,02 (m, 2H, H_5 , H_5' Thz);
 5 3,24-3,34, 3,64-3,75, 3,77-3,86 (3m, 2H, H_4 , H_4' Thz); 3,96, 4,41 et 4,45, 4,54 (2 x 2d, $J = 2 \times 8,8$ et $2 \times 10,3$ Hz, 2H, H_2 , H_2' Thz), 4,60-4,69 (m, 1H, α H cys); 6,05-6,15 (m, 1H, NH cys); 7,18-7,34, 7,36-7,44 (2m, 15H, H aromatiques).

SM : $(\text{FAB}^+/\text{G-T}) m/z$ 953 $(2\text{M}+\text{H})^+$, 477 $(\text{M}+\text{H})^+$.

10 Analyse : $\text{C}_{27}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}_2$ (476)

Calc. % : C 68,07 H 5,88 N 5,88

Tr. % : 67,97 5,84 5,89

2.46. *N*-(*N*-ACETYL-L-CYSTEINYL)THIAZOLIDINE (I-212)

15

Ce composé est obtenu par la S-détritylation de **18** (0,77 mmoles). Le protocole utilisé est le même que celui décrit dans l'exemple 1 pour la synthèse de la **I-152**. Après une nuit d'agitation à la température ambiante, on obtient une solution. Cette solution est évaporée à sec
 20 sous vide et le résidu pâteux obtenu est coévaporé avec du toluène (3 x 5 ml) puis lavé avec 4 x 15 ml d'éther pour fournir le sulfure d'argent correspondant sous forme d'une poudre jaune. Ce sulfure est ensuite traité de la même façon que celle décrite dans l'exemple 1. Après les
 25 différents traitements, on recueille une gomme translucide qui est purifiée par "flash" chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : AcOEt). On isole la **I-212**, sous forme d'une gomme incolore, avec un rendement de 64%. R_f (AcOEt/MeOH, 9,7 : 0,3) : 0,40. Cristallise dans un mélange d'AcOEt/hexane sous forme d'aiguilles incolores. $F = 90-91^{\circ}\text{C}$. $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -31^{\circ}$ (c 1; CHCl_3).

RMN ^1H (CDCl_3) δ ppm (mélange isomérique, 5,8 : 4,2): 1,55 (t app., $J = 8,9$ Hz, 1H, SH); 2,02 (s, 3H, NCOCH_3); 2,75-2,84, 2,85-2,95 (2m, 2H, CH_2 cys); 2,99-3,18 (m, 2H, H_5 , H_5' Thz); 3,79-4,03 (m, 2H, H_4 , H_4' Thz); 4,57, 4,63 et 4,71 (2d, $J = 2 \times 10,4$ et 1s app., 2H, H_2 , H_2' Thz);
 5 4,94-5,04 (m, 1H, α H cys); 6,41-6,52 (m, 1H, NH cys).

SM : ($\text{FAB}^+/\text{G-T}$) m/z 235 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

Analyse : $\text{C}_8\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}_2$ (234)

Calc. % :	C 41,03	H 5,98	N 11,97
Tr. % :	41,12	6,01	11,96

10

2.47. *N*-(*N,S*-BIS-ACETYL-*L*-CYSTEINYL)THIAZOLIDINE (**I-213**)

La S-acylation de la **I-212** (0,26 mmole), avec de l'anhydride acétique, est réalisée selon la méthode générale décrite dans l'exemple
 15 2. Le mélange réactionnel est ensuite traité suivant le protocole décrit pour la synthèse de la **I-177**. Après les différents traitements, on recueille une gomme qui est purifiée par "flash" chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : AcOEt/éther de pétrole 10%). On isole la **I-213** sous forme d'une gomme (Rdt = 80%) qui cristallise dans un
 20 mélange d'AcOEt/éther de pétrole en aiguilles incolores. R_f (AcOEt) :

0,3. $F = 107-108^\circ\text{C}$. $[\alpha]_D^{20} = +6,6^\circ$ (c 1,36; CHCl_3).

RMN ^1H (CDCl_3) δ ppm (mélange isomérique, 5,9 : 4,1): 2,01 (s, 3H, NCOCH_3); 2,36 (s, 3H, SCOCH_3); 2,97-3,20, 3,26-3,29, 3,30-3,33 (3m, 4H, CH_2 cys, H_5 , H_5' Thz); 3,73-3,81, 3,82-3,89, 3,96-4,06 (3m, 2H, H_4 , H_4' Thz); 4,49, 4,61, 4,71, 4,81 (2 x 2d, $J = 2 \times 10,3$ et $2 \times 8,9$ Hz,
 25 2H, H_2 , H_2' Thz), 4,93-5,04 (m, 1H, α H cys); 6,39-6,50 (m, 1H, NH cys).

SM : ($\text{FAB}^+/\text{G-T}$) m/z 553 ($2\text{M}+\text{H}$) $^+$, 277 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

Analyse : $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}_2$ (276)

30 Calc. % :	C 43,48	H 5,80	N 10,14
--------------	---------	--------	---------

Tr. % : 43,58 5,82 10,11

**EXEMPLE 3: MISE EN EVIDENCE DE L'ACTIVITE ANTIVIRALE DES
5 COMPOSES OBTENUS AUX EXEMPLES 1 et 2.**

3.1. Préambule

Les manipulations du matériel infectieux ont été réalisées dans
10 un laboratoire de haute sécurité de type L3. De façon à être le plus
proche des conditions physiopathologiques, l'ensemble des études a été
mené à l'aide de cultures primaires de MDM, de CMSP ou de LSP
obtenus à partir de donneurs de sang sains.

Dans toutes les expériences, les effets des nouvelles molécules ont
15 été comparés à ceux des molécules de référence : NAC, ou MEA.

3.2. Isolement, culture et activation des cellules

3.2.1. Milieux de culture

20 Le milieu A est composé de milieu de culture cellulaire RPMI 1640
(Life Technologies) supplémenté par 10% de sérum de veau foetal (SVF,
Boehringer Mannheim) décomplémenté par la chaleur à 56 °C pendant
30 min, de 2 mM de L-Glutamine (Boehringer Mannheim), et d'une
solution à 100 µg/ml de 3 antibiotiques (pénicilline, streptomycine,
25 néomycine; PSN, Life Technologies). Le milieu B est constitué de milieu
A supplémenté par 20 UI/ml d'IL-2 humaine recombinante (Boehringer
Mannheim).

3.2.2 Isolement des cellules mononuclées du sang périphérique

30 Les CMSP sont séparées des autres éléments figurés du sang par
centrifugation en gradient de ficoll (MSL 2000, Eurobio) : 30 ml de sang,
d'un donneur sain, dilués au tiers sont déposés sur un coussin de 20

ml de ficoll. Après 20 min de centrifugation à 850 g, l'anneau de CMSP est prélevé puis lavé 2 fois dans du RPMI 1640, après 10 min de centrifugation à 750 g et 5 min à 400 g.

5 3.2.3. Isolement des monocytes et des lymphocytes

Les monocytes et les lymphocytes sont isolés à partir des CMSP par élutriation à contre-courant selon le protocole décrit par C. Figdor et coll. (*Cell. Biophys.* 1983, 5, 105-118). Les deux populations cellulaires ainsi séparées sont immunophénotypées puis analysées à l'aide d'un cytomètre en flux (FACScan, Becton Dickinson). La pureté des monocytes et des LSP, ainsi obtenus, est supérieure ou égale à 95%.

3.2.4. Culture et activation des cellules

15 Un million de monocytes, dans 1 ml de milieu de culture A, sont répartis dans chaque puits d'une plaque de 48 puits (Becton-Dickinson). Les monocytes sont laissés à différencier en macrophages pendant 7 jours. Les macrophages ainsi différenciés sont maintenus en culture dans du milieu A.

20 Pour certaines expériences, les CMSP ainsi que les LSP sont activés pendant 48 h par 1 µg/ml d'un mitogène, la PHA-P (Difco Laboratories). Les CMSP et les LSP sont cultivés en milieu A (quiescentes) ou B (activées). Les cellules sont cultivées à 37 °C, en atmosphère saturée en humidité, sous 5% de CO₂. Les surnageants de culture sont prélevés, et les milieux de culture sont renouvelés tous les trois ou quatre jours. A chaque renouvellement des milieux de culture, la viabilité cellulaire est évaluée par une coloration au bleu Trypan ou par une observation microscopique.

3.3. Evaluation de l'activité antivirale de la I-152 et de ses dérivés

3.3.1. Préparation des composés

Lors de la première série d'évaluation de l'activité antivirale et lors
5 de l'étude du mécanisme d'action de la I-152, la I-152 et les produits de
référence ont été solubilisés dans le milieu A. Les molécules ont été
resuspendues à des concentrations stock (NAC : 20 mM, MEA et
I-152 : 10 mM) et ont été conservées à -80°C. Les dilutions ont ensuite
été préparées extemporanément dans du milieu A.

10 Lors de la deuxième série d'évaluation de l'activité antivirale, la I-
152 et ses dérivés (insolubles dans le milieu A), ont été solubilisés dans
le DMSO puis dilués dans du milieu A. La concentration en DMSO au
cours de cette étude est de 1,5%. Les solutions et les dilutions ont été
réalisées extemporanément afin d'éviter ou de réduire l'oxydation de la
15 I-152, par le DMSO, en son disulfure.

3.3.2. Virus et infection des cellules

Les MDM ont été infectés par l'isolat de référence à tropisme
macrophagique, VIH-1/Ba-L. Les CMSP et les LSP ont été infectés par
20 l'isolat de référence à tropisme lymphocytaire VIH-1-LAI. Les stock
viraux ont été constitués en amplifiant *in vitro* ces souches à l'aide de
cellules mononucléées du sang ombilical (CMSO) activées
préalablement par 1 µg/ml de PHA-P et cultivées dans du milieu A
supplémenté par 20 UI/ml d'IL-2. Afin d'éliminer les facteurs solubles
25 tels que les cytokines, les surnageants de culture ont été
ultracentrifugés à 360 000 g pendant 5 min, et les culots ont été
resuspendus dans du RPMI 1640. Les stocks viraux ainsi constitués ont
été ensuite titrés à l'aide de CMSP activées par la PHA-P. Les TCID50
(50% Tissue Culture Infectious Dose) ont été calculées en utilisant la
30 formule de Kärber.

Un million de MDM ont été infectés par 10 000 TCID50 de la
souche VIH-1/Ba-L. Cette quantité de virus correspond à une

multiplicité d'infection (m.o.i.) égale à 0,01. L'excès de virus est éliminé 24 h après, en lavant les cellules à l'aide de RPMI 1640. Les LSP et les CMSP ont été infectés par 10 000 TCID₅₀ de la souche VIH-1-LAI (moi = 0,01). Les cellules sont lavées au terme du deuxième jour d'infection.

5

3.3.3. Dosage de la réplication virale dans les surnageants de culture

3.3.3.1 Dosage de l'activité transcriptase inverse (TI)

La réplication virale est mesurée par le dosage de l'activité TI dans les surnageants de culture selon la technique décrite par F. Rey et coll. (Biochem. Biophys. Res. Comm. 1984, 121, 126-133). La radioactivité incorporée lors de l'élongation du brin complémentaire d'une matrice synthétique poly-rA en présence d'une amorce oligo-dT₁₂₋₁₈ et d'un substrat radiomarké, la [³H-méthyl]thymidine-5'-triphosphate ([³H]TTP), permet de doser l'activité enzymatique de la TI. 400 µl de surnageant sont ultracentrifugés à 360 000 g pendant 5 min. La TI est libérée par la lyse du culot viral dans 20 µl de NTE-Triton (NaCl 100 mM, Tris 10 mM, EDTA 1 mM, Triton X-100 0,1%). Ces 20 µl sont ensuite incubés avec 40 µl du mélange réactionnel suivant : Tris 62,5 mM, pH 7,8; KCl 25 mM; MgCl₂ 6,25 mM; dithiothréitol (DTT) 1,25 mM; poly-rA et oligo-dT₁₂₋₁₈ 2,5 x 10⁻³ UDO, [³H]TTP 5,55 x 10⁻³ TBq. Au bout d'une heure à 37 °C, la réaction enzymatique est arrêtée, et les brins néosynthétisés sont précipités pendant 20 min à 4 °C par l'ajout de 1 ml de pyrophosphate de sodium (PPNa), de 50 µl d'ADN de levure (0,1 mg/ml en acide trichloroacétique (TCA) 5%), et de 4 ml de TCA 20%. Le mélange est filtré au moyen d'une membrane d'acétate de cellulose (Millipore) qui retient les chaînes poly-dT radiomarkées. Le filtre est lavé à l'aide de 20 ml de TCA 5%, l'eau résiduelle est éliminée par ajout de 25 µl d'éthanol à 70%. Le filtre est séché à l'étuve pendant 10 minutes à 80 °C puis est introduit dans des fioles contenant 8 ml de liquide scintillant. La radioactivité β est quantifiée au moyen d'un compteur à scintillation (Packard Bell). Les résultats sont exprimés en

30

pM de [³H]-TMP incorporées/h/ml de surnageant ou, plus simplement, en cpm/h/ml.

3.3.3.2 Dosage de la protéine P25

5 Le dosage de la protéine p25 est effectué à l'aide de la trousse ELISA de DuPont de Nemours. 200 µl du surnageant de culture à tester sont placés dans un puits d'une plaque de microtitration. L'ajout de 20 µl de tampon de lyse libère les protéines virales dans le milieu. L'antigène libéré se fixe à un anticorps monoclonal de souris anti-p25
10 immobilisé au fond des puits. Après incubation de 2 h à 37 °C, 3 lavages à l'aide de 5 ml de tampon de lavage sont réalisés puis 100 µl d'un anticorps polyclonal biotinylé réagissant avec l'antigène immobilisé sont incubés pendant 1 h à 37 °C. Une série de 3 lavages dans le même tampon et avec le même volume est de nouveau effectuée avant l'ajout
15 pendant 15 mn à 37 °C de 100 µl de conjugué peroxydase de Raifort-streptavidine qui permettra d'amplifier la réaction colorimétrique. Le complexe formé est révélé, après 3 lavages à l'aide de 5 ml du tampon de lavage de la trousse, par 100 µl de dichlorhydrate d'o-phénylènediamine (OPD). Au terme de 30 min d'incubation à la
20 température ambiante, la réaction est arrêtée par l'ajout de 100 µl d'acide sulfurique 4N. La DO de la coloration ainsi obtenue est lue à 490 nm. Cette absorbance est directement proportionnelle à la quantité d'antigène fixé. La relation linéaire liant la D.O. à la concentration de p25 est établie grâce à une gamme étalon réalisée à partir d'une
25 solution de p25 recombinante.

3.3.4. Analyse des résultats et détermination des doses effectrices 50%

Les doses effectrices 50% (DE50) sont calculées à partir des activités TI cumulées en utilisant le logiciel "Dose-effects analysis with
30 microcomputers" mis au point par J. Chou & T.C. Chou.

3.3.5. Mesure de la viabilité cellulaire

Ces tests sont systématiquement menés en parallèle de l'évaluation de l'activité antivirale. Compte-tenu du pouvoir oxydo-réducteur des molécules testées, le test au sel de tétrazolium, mesurant l'activité des déshydrogénases mitochondriales n'a pu être utilisé.

5

3.3.5.1. Mesure à l'aide d'un colorant d'exclusion, le bleu Trypan

Les cellules non adhérentes, comme les CMSP et les LSP, sont numérées à l'aide d'une cellule de Malassez et d'un colorant d'exclusion, le bleu Trypan (BT). 25 µl de la suspension cellulaire sont
10 ajoutés à 475 µl de BT. Cette numération est effectuée après l'isolement des CMSP et des LSP, avant la mise en plaque, et à chaque renouvellement du milieu de culture.

3.3.5.2. Mesure à l'aide d'un colorant vital, le rouge neutre

15 Le rouge neutre (RN) est un colorant vital qui permet de mesurer la viabilité des cellules adhérentes comme les MDM. 600 µl de surnageant de culture sont éliminés et remplacés par 400 µl d'une solution de RN (0,001% m/v dans du tampon phosphate, PBS, Boehringer Mannheim), filtrée à 0,45 µm. Les cellules sont incubées 1 h
20 à 37 ° C, et sont ensuite lavées (2 x 1 ml de PBS). Les cellules sont alors lysées à -20 °C avec 200 µl d'un mélange d'éthanol à 50% contenant 1% d'acide acétique glacial. La DO est mesurée deux fois sur 100 µl de solution à l'aide d'un spectrophotomètre.

25 3.4. Etude du mécanisme d'action de la I-152

3.4.1. Quantification des ADN proviraux par PCR

La I-152 est constituée de MEA et de NAC qui sont susceptibles d'interagir avec les phases précoces du cycle biologique du VIH. A ce
30 titre, elle est capable de diminuer l'intégration du provirus au sein du génome cellulaire. Afin de mesurer ces effets, les ADN proviraux ont été quantifiés par PCR. Les cellules ont été lysées à l'aide de 1 ml de la

solution de lyse suivante: 10 mM de Tris HCl pH 8; 100 mM d'EDTA pH 8; 0,5% de dodecyl sulfate de sodium (SDS); 20 µg/ml de RNase pancréatique bovine DNase-free. 200 µg/ml de protéinase K sont ensuite ajoutés à cette suspension. Les ADN ont été ensuite extraits à l'aide de 1 ml d'une solution saturée et glacée de phénol, et de 1 ml d'une solution de phénol/Chisam.

Les ADN viraux ont alors été amplifiés au moyen d'amorces spécifiques du gène *gag* (SK01/SK39) et d'une gamme étalon de la lignée 8E5, lignée chroniquement infectée dont les cellules sont porteuses d'une copie provirale. Le gène de la β-globine a été utilisé comme gène rapporteur afin de s'assurer de la qualité de l'extraction d'ADN.

3.4.2. Test acellulaire de l'activité enzymatique de la TI

La molécule I-152 est constituée de NAC et de MEA qui sont susceptibles d'inhiber l'activité de la TI (A. Bergamini et coll. *J. Clin. Invest.* 1994, 93, 2251-2257). De ce fait, le pouvoir inhibiteur de la I-152 vis à vis de l'activité TI a été mesuré à l'aide d'un test acellulaire. Ce test a été réalisé selon le protocole décrit précédemment (§ 3.3.3.1.). Dans le mélange réactionnel, seuls les 20 µl d'eau sont remplacés par 20 µl d'une concentration de I-152 ou des composés de référence. L'héparine, connue pour inhiber l'activité de la TI et des autres ADN polymérases, est utilisée comme contrôle positif d'inhibition.

3.4.3. Dosage du glutathion total

La méthode de dosage du glutathion (GSH + GSSG) que nous avons utilisée est une adaptation, au système de culture de MDM, de celle décrite par O.W. Griffith et coll. (*Anal Biochem.* 1980, 106, 207-212). Les dosages ont été réalisés 24 h après le début du traitement par les différents composés. Un million de cellules sont lavées trois fois en PBS, puis lysées par 150 µl d'un tampon de lyse (Phosphate 0,1 M pH = 7,4; NaCl 0,15 M; BSA 0,1%; Azide 0,01%; Triton X-100 0,1%; acide 5'-

sulfosalicylique 0,05%). La gamme étalon de raison deux s'échelonne de 50 μ M à 1,5 nM de GSSG ou de GSH. Le test est réalisé en triplicat. 85 μ l de 0,6 mM de NADPH, 25 μ l de 6 mM de DTNB, et 130 μ l d'eau pure sont rajoutés dans les échantillons. Ces derniers sont incubés à 30°C pendant 10 min. Au moment de la lecture, 20 μ l de GSSG réductase à 1 U/ml sont ajoutés dans tous les puits. L'absorbance est mesurée au long cours à 412 nm. La concentration en glutathion total est ensuite déterminée par rapport aux valeurs de la courbe d'étalonnage, réalisée en parallèle du dosage, et par l'extrapolation au niveau de la partie linéaire de la courbe.

EXEMPLE 4: ACTIVITE ANTI-VIH DE LA I-152 VIS-A-VIS DES MACROPHAGES

4.1. Activité antivirale de la I-152 vis-à-vis de MDM infectés extemporanément

4.1.1. Doses effectrices 50, 70 et 90% et cytotoxicité de la I-152

Les cellules de la lignée macrophagique jouent un rôle majeur dans les « process » oxydatifs. La molécule pro-GSH, I-152, a donc été testée vis-à-vis de MDM infectés par la souche VIH-1/Ba-L. La I-152 après métabolisation intracellulaire est susceptible de libérer de la NAC, de la MEA et de la cystéine (figure 1).

Nous avons comparé les activités de la I-152 à celles de ses deux composantes, la NAC et la MEA, dans notre système expérimental. La I-152 possède une forte activité antivirale, supérieure à celle de la NAC ou de la MEA (Figure 2, Tableau I). Les concentrations inhibitrices de la NAC, de la MEA, et de la I-152 sont respectivement égales à 9,4 mM; 300 μ M et 50 μ M. A la vue de ces chiffres, la I-152 apparaît donc 6 et 188 fois plus efficace que la MEA et la NAC. Toutefois, ces valeurs ne reflètent pas l'écart entre ces trois produits. En effet, aux doses

antivirales, la NAC et la MEA sont cytotoxiques alors que la I-152 ne l'est pas. Ainsi, la NAC est cytotoxique dès 10 ou 15 mM (Figure 3 : NAC 15 mM : 70% de cytotoxicité; NAC 40 mM : 91%), et la MEA diminue la viabilité des MDM de 65% à la concentration de 500 μ M (Figure 3). En revanche, la I-152 même à des doses 10 fois supérieures à sa dose effectrice (DE) 50% n'est pas cytotoxique (Figure 3: 500 μ M).

4.1.1.2. Effet de la I-152 sur la production de la protéine majeure de la nucléocapside virale

La réplication virale peut être mesurée dans les surnageants de culture en dosant soit l'activité enzymatique de la TI soit la protéine majeure de la nucléocapside virale, p25. Dans les cultures de MDM infectés, l'inhibition de la production de la protéine p25 est concomitante de celle de l'activité TI (Figure 4). Ces résultats confirment donc l'efficacité antivirale de la I-152.

4.1.1.3. Effet de la multiplicité d'infection sur l'activité antivirale de la I-152

Au cours de nos premières expériences, les cellules étaient infectées à l'aide de 10 000 TCID₅₀ (m.o.i. : 0,01). Afin de mesurer les effets de la charge virale sur l'activité anti-VIH de la I-152, les cellules ont été infectées, dans un second temps, à l'aide de 1 000 TCID₅₀ (m.o.i. : 0,001).

L'activité antivirale de la I-152 augmente lorsque la m.o.i. est diminuée (Figure 5), et la DE s'en trouve diminuée (Tableau II, 3 μ M *vs.* 50 μ M).

4.1.2. Activité antivirale de la I-152 vis-à-vis de MDM préalablement infectés

Le traitement des cellules 7 jours après l'infection, confirme l'activité antivirale de la I-152 (Figure 6). En effet, à la dose de 500 μ M, la réplication virale est éteinte. Toutefois, dans ces conditions

expérimentales, la dose de 250 μ M est inefficace. Ce décalage du potentiel inhibiteur, observé entre les différents modes de traitement, suggère 1) que la I-152 inhibe la réplication virale en associant probablement deux mécanismes : un précoce et un tardif, et 2) qu'à forte dose ($\geq 500 \mu$ M), l'inhibition de la phase tardive du cycle biologique est suffisante.

4.2. Activité antivirale de la I-152 dans des cultures primaires de lymphocytes et de cellules mononucléées du sang périphérique

10

Après avoir montré l'activité antivirale de la I-152 vis-à-vis des cellules de la lignée macrophagique, ses effets ont été mesurés vis-à-vis de lymphocytes du sang périphérique (LSP) et d'une population mixte contenant des monocytes/macrophages et des lymphocytes, les CMSP. De plus, afin de mesurer les effets de l'activation cellulaire sur l'activité antivirale de la I-152, les cellules ont été ou non activées par un mitogène, la phytohémagglutinine-P (PHA-P).

15

4.2.1. Viabilité des CMSP et des LSP traités par la I-152

20

La viabilité cellulaire a été mesurée en parallèle à l'estimation de l'activité antivirale. A chaque renouvellement du milieu de culture, les cellules viables ont été numérées au moyen d'un colorant d'exclusion, le Bleu Trypan. Dans les cultures de CMSP et de LSP, la I-152 n'est pas cytotoxique. En effet, la viabilité des lymphocytes n'est pas diminuée dans les cultures de LSP et de CMSP, et, d'autre part dans ces dernières, lorsque les cellules ne sont pas exposées à la PHA-P, les monocytes se différencient en macrophages avec un aspect pseudofibroblastique. En revanche, la NAC et la MEA sont cytotoxiques pour les deux types cellulaires dès les doses de 10 ou 15 mM et 500 μ M, respectivement.

30

4.2.2 Activité antivirale de la I-152 vis-à-vis de CMSP quiescentes ou activées par la PHA-P, et infectées

Les CMSP, quiescentes ou activées par la PHA-P, ont été infectées par la souche de référence à tropisme lymphocytaire VIH-1-LAI. Toutes les cultures ont été menées en parallèle, et les drogues ont été maintenues tout au long de la culture.

Dans les deux populations cellulaires, la MEA et la NAC n'inhibent pas la réplication virale, aux doses non cytotoxiques (Résultats non présentés). Dans les CMSP quiescentes, la I-152 inhibe la réplication virale de 97 et 88%, respectivement aux doses de 250 et 125 μ M et, dans les CMSP activées, la réplication virale est diminuée de 42 et 25% aux mêmes doses (Figure 7).

4.2.3. Activité antivirale de la I-152 vis-à-vis de LSP quiescents ou activés par la PHA-P, et infectés par la souche VIH-1-LAI

Comme dans les cultures de CMSP, la MEA et la NAC n'ont pas ou peu d'activité antivirale dans les LSP (Résultats non présentés). En revanche, la I-152 inhibe la réplication virale dans les LSP quiescents ou activés par la PHA-P (Figure 8).

4.3. Activité anti-VIH de la I-152 vis-à-vis de macrophages tissulaires

4.3.1. Isolement des monocytes/macrophages spléniques

La rate est disséquée et tamisée, puis les cellules mononucléées sont isolées par un gradient de densité sur un coussin de Ficoll. Les monocytes/macrophages sont obtenus par adhérence au plastique. Les monocytes ont été laissés à différencier en macrophages pendant 7 jours, date à laquelle ils ont été infectés.

4.3.2. Résultats

Le monocyte/macrophage joue un rôle délétère dans la physiopathologie des infections par le VIH parce qu'il constitue un site important de la réplication rétrovirale au niveau des tissus. Parce que ces tissus sont peu accessibles à la thérapeutique anti-VIH actuelle, cette population cellulaire est considérée comme un "réservoir".

La réplication rétrovirale au sein de cette population cellulaire, et donc l'efficacité d'une molécule comme la I-152, est conditionnée, pour une part, par le niveau de différenciation cellulaire. Il était donc important de s'assurer de l'efficacité antivirale de la I-152 dans des monocytes/macrophages dont le degré de maturation est susceptible d'être différent de celui des MDM. Nous avons donc évalué l'activité antivirale de la I-152 et sa capacité à régénérer le taux intracellulaire de GSH dans des macrophages spléniques. Dans cette population cellulaire, la souche VIH-1/Ba-L se réplique également à haut bruit. La molécule I-152 s'est avérée aussi efficace dans les macrophages spléniques humains que dans les macrophages dérivés des monocytes sanguins. En effet, la concentration de 38 μ M diminue de 50% la réplication du VIH dans cette population cellulaire splénique (Tableau III). De même, comme dans les macrophages dérivés des monocytes sanguins, la I-152 augmente le taux intracellulaire de GSH de façon dose-dépendante et saturable à partir de 250 μ M (Figure 15). Il est à noter que dans les macrophages spléniques comme dans les macrophages dérivés des monocytes sanguins, l'infection par le VIH engendre un déficit en GSH (MDM; Figure 16).

4.4. Mécanisme d'action de la I-152

4.4.1. Effet de la I-152 sur l'intégration du génome proviral au sein du génome cellulaire

Les expériences de culture cellulaire suggéraient que la I-152 inhibait la réplication du VIH en associant probablement deux

mécanismes, l'un précoce et l'autre tardif. Afin de mesurer les effets de cette molécule sur les phases précoces du cycle biologique du VIH, l'intégration du provirus au sein du génome cellulaire a été quantifiée par PCR. La I-152 inhibe l'intégration du provirus. Cette inhibition est
5 largement supérieure à celle induite par la NAC ou la MEA. En revanche, elle n'est pas totale à la différence de celle induite par 10 μ M d'AZT (Figure 9).

4.4.2. Effet de la I-152 sur l'activité enzymatique de la TI dans un 10 système acellulaire

Compte-tenu des résultats précédents et parce que la MEA est susceptible d'inhiber l'activité de la TI, les effets de la I-152 sur l'activité de cette enzyme ont été mesurés dans un système acellulaire. L'expérience a été doublée, et l'héparine a été utilisée comme témoin de
15 l'inhibition de l'activité de la TI. Dans les deux cas, l'héparine à la concentration de 1 mg/ml inhibe totalement l'activité TI de l'isolat VIH-1-LAI. Cette inhibition est dose-dépendante. De même, la MEA diminue de $29 \pm 1\%$ (Exp. 1, Figure 10) et $48 \pm 4\%$ (Exp. 2 non présentée) à la dose de 500 μ M. En revanche, la NAC et la I-152 ne présentent pas
20 d'activité inhibitrice vis-à-vis de la TI du VIH dans notre système expérimental (Figure 10). Ces résultats confirment que la I-152, en libérant la MEA, peut interagir avec une étape précoce du cycle biologique du VIH.

25 4.4.3. Effet de la I-152 sur la concentration intracellulaire du glutathion

Les effets tardifs de la I-152 sont probablement la conséquence plus directe de son activité pro-glutathion. Afin de s'assurer de cette activité dans les lymphocytes et les macrophages, les concentrations intracellulaires de glutathion total (GSH + GSSG) ont été déterminées
30 dans les cultures de CMSP (Figure 11). Des deux molécules de référence, la NAC possède la meilleure capacité à augmenter le taux intracellulaire de glutathion dans les CMSP quiescentes. En effet, la

MEA ne module pas significativement le taux intracellulaire de glutathion, tout du moins aux doses testées. Dans nos expériences, les doses utilisées de NAC sont plus élevées que celles de MEA, ceci peut expliquer la différence observée dans le taux intracellulaire de glutathion.

La I-152 augmente le taux intracellulaire de glutathion. Cette augmentation suit une courbe en cloche avec un optimum à 25 et 125 μM . La dose de 125 μM de I-152 augmente la concentration cellulaire jusqu'à $2,64 \pm 0,13 \mu\text{M}$. Cette concentration intracellulaire est équivalente à celle obtenue avec la dose de 15 mM de NAC. En considérant les concentrations de molécules supplémentant le milieu de culture, la I-152 est 120 fois plus active que la NAC. Il est à noter que les concentrations intracellulaires de glutathion diminuent aux fortes concentrations, tout du moins pour la MEA (500 μM) et la I-152 (250 μM). Ce phénomène est probablement la conséquence des processus de régulation du glutathion.

4.5. Activité antivirale des dérivés S-acylés de la I-152: I-176, I-177, I-178 vis-à-vis des MDM infectés extemporanément

20

Lors d'une deuxième série d'expériences, les activités antirétrovirales des dérivés de la I-152 ont été testées vis-à-vis des MDM infectés par la souche VIH-1/Ba-L (Figure 12). Ces molécules sont lipophiles et ont donc été solubilisées dans du diméthyl sulfoxyde (DMSO) puis diluées. La I-152, servant de référence, a été traitée de la même façon. Dans ces conditions expérimentales, la I-152 s'est avérée la plus efficace à inhiber la réplication virale. Toutefois, il est à noter que le DMSO diminue son efficacité antivirale, et que l'écart type est important car l'activité antivirale a été diminuée sur deux des trois puits du triplicat de culture. Le composé I-176 est légèrement toxique à 150 μM , ceci peut expliquer aussi la variabilité au sein du triplicat de culture et la taille de l'écart-type observé. A ce jour, aucun des dérivés

30

S-acylés n'a montré, *in vitro*, une activité supérieure à celle de la molécule mère. Néanmoins, les I-177 et 178 ont des activités proches de la I-152 et, compte-tenu de l'importance de cette dernière, ces deux molécules, plus lipophiles, sont à retenir. Elle peuvent présenter des avantages dans le cas d'expérimentations cliniques. En effet, elles sont susceptibles d'avoir des formes galéniques et des modes d'administrations différents de ceux de la I-152.

10 **EXEMPLE 5 : EFFET DE LA I-152 SUR LA CONCENTRATION INTRACELLULAIRE DU GSH**

5.1. Matériels et méthodes

15 A l'exception de matériels et méthodes présentés ci-après, les modes opératoires sont semblables à ceux décrits dans les précédents exemples.

Le GSH intracellulaire a été dosé au moyen de la trousse de dosage commercialisée par la Société Cayman. Cette méthode de dosage du glutathion est une adaptation de celle décrite par O.W. Griffith *et al.* (1980).

Le composé I-152 et ses dérivés sont préparés extemporanément en étant solubilisés dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) à la concentration de 100 mM. Ils sont ensuite stockés à -20°C après avoir été dilués 10 fois dans du tampon phosphate (PBS).

5.2. Résultats

Les effets du composé I-152 à augmenter la concentration intracellulaire de GSH ont été démontrés dans des cellules non exposées à un stress oxydatif. Les résultats présents montrent que cette molécule est également capable de régénérer un taux intracellulaire

anormalement bas. En effet, l'infection des macrophages dérivés des monocytes sanguins (MDM) humains engendre un déficit intracellulaire de GSH (Figure 13); ce déficit s'accompagne d'une augmentation de l'expression des enzymes impliquées dans le maintien de ce taux et d'une augmentation du 8 iso-prostane, témoin d'un stress oxydant (résultats non présentés).

EXEMPLE 6 : EFFET DE LA I-152 SUR LA SYNTHÈSE MACROPHAGIQUE DE TNF- α

6.1. Matériels et méthodes

A l'exception de matériels et méthodes présentés ci-après, les modes opératoires sont semblables à ceux décrits dans les précédents exemples.

La synthèse du facteur nécrosant des tumeurs (TNF- α) a été quantifiée dans les surnageants de culture de MDM à l'aide de la trousse colorimétrique commercialisée par la Société Cayman.

Le composé I-152 et ses dérivés sont préparés extemporanément en étant solubilisés dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) à la concentration de 100 mM. Ils sont ensuite stockés à -20°C après avoir été dilués 10 fois dans du tampon phosphate (PBS).

6.2. Résultats

Le facteur nécrosant des tumeurs (TNF)- α comme les éléments radicalaires oxygénés ou azotés joue un rôle majeur dans les processus apoptotiques associés à l'infection par le VIH. De plus, les éléments radicalaires peuvent favoriser la synthèse de cette cytokine pro-inflammatoire. De ce fait, les effets de la I-152 à diminuer la synthèse du TNF- α ont donc été recherchés dans les MDM stimulés par un lipopolysaccharide bactérien et l'interféron (IFN)- γ . Le composé I-152

inhibe la synthèse de TNF- α et augmente la concentration de GSH dans ces conditions expérimentales (Figure 14).

5 **EXEMPLE 7 : POTENTIALISATION DE L'ACTIVITE ANTI-RETROVIRALE DE L'AZT PAR LE COMPOSE I-152**

7.1. Matériels et méthodes

10 A l'exception de matériels et méthodes présentés ci-après, les modes opératoires sont semblables à ceux décrits dans les précédents exemples.

La réplication virale a été mesurée en dosant l'activité transcriptase inverse dans les surnageants de culture à l'aide de la
15 trousse RetroSys de la société Innovagen en respectant les recommandations de la Société.

Le composé I-152 et ses dérivés sont préparés extemporanément en étant solubilisés dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) à la concentration de 100 mM. Ils sont ensuite stockés à -20°C après avoir
20 été dilués 10 fois dans du tampon phosphate (PBS).

7.2. Résultats

Les composés pro-GSH de la "famille I-152" sont de préférence
25 administrés comme thérapeutique adjuvante aux antirétroviraux actuels. Les inventeurs ont donc cherché à mesurer *in vitro* les effets de I-152 vis-à-vis de l'efficacité anti-VIH de ces molécules. Cette étude a été réalisée au moyen de macrophages dérivés des monocytes sanguins humains infectés par la souche VIH-1/Ba-L, et selon la méthodologie
30 décrite par J. et TC. Chou pour quantifier les effets synergiques, additifs ou antagonistes entre deux molécules.

Dans notre modèle expérimental, le composé I-152 potentialise l'activité anti-VIH de l'AZT. En effet, l'indice de combinaison (IC) est inférieur à 1 ce qui témoigne d'une synergie entre les deux composés testés (Figure 17).

5

EXEMPLE 8 : ACTIVITE ANTI-RETROVIRALE DES ANALOGUES ACYLES DE LA I-152 OU DE SES DERIVES

10 **8.1. Matériels et méthodes**

A l'exception de matériels et méthodes présentés ci-après, les modes opératoires sont semblables à ceux décrits dans les précédents exemples.

15 Les doses effectrices 50% (DE50) sont calculées à partir des activités TI cumulées en utilisant le logiciel "Dose-effects analysis with microcomputers" mis au point par J. Chou & T.C. Chou.

Le composé I-152 et ses dérivés sont préparés extemporanément en étant solubilisés dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) à la
20 concentration de 100 mM. Ils sont ensuite stockés à -20°C après avoir été dilués 10 fois dans du tampon phosphate (PBS).

8.2. Résultats

25 L'activité anti-VIH d'une vingtaine de dérivés de la I-152, en plus de celle des composés S-acylés I-176, I-177 et I-178, a été évaluée dans le système de MDM infectés *in vitro* par la souche VIH-1/Ba-L. Ces composés cherchaient, pour une part, à être plus lipophiles; ils sont ainsi susceptibles de permettre des formes galéniques et des modes
30 d'administrations différents de ceux de I-152. D'autre part, ces dérivés constituent le premier maillon de l'étude de structure-activité qui doit permettre d'identifier les résidus importants dans l'activité de cette

famille de composés. Les solutions " stocks " de ces composés ont été soniqués afin d'améliorer la solubilité des produits.

Neuf composés ont démontré une activité antivirale significative du même ordre que celle de la I-152 (Tableaux IV et V). Les valeurs
5 obtenues avec le composé I-152, présentées dans ces deux tableaux, illustrent parfaitement la reproductibilité des effets anti-VIH de la I-152 d'une expérience à l'autre et d'un donneur de cellules à l'autre. En effet, les valeurs présentées dans le tableau III sont issues d'une première expérience réalisée à l'aide des cellules d'un donneur, et celles
10 présentées dans le tableau IV, d'une seconde expérience réalisée à l'aide des cellules d'un autre donneur.

En conclusion, le composé I-152 ou l'un de ses analogues ou de ses dérivés constitue une excellente thérapeutique adjuvante aux
15 antirétroviraux actuels tels que l'AZT et éventuellement aux autres classes de molécules antirétrovirales actuellement utilisées en clinique humaine (i.e. les inhibiteurs non-nucléosidiques de la transcriptase inverse et les inhibiteurs de la protéase virale) en étant capable de réorganiser aussi bien les atteintes du système immunitaire que celles
20 du métabolisme oxydatif. De plus, ces résultats ont mis en évidence les activités biologiques d'autres molécules dérivées et/ou analogues de la I-152 objet de la présente invention; ce qui constitue dorénavant une famille de molécules biologiquement actives et potentiellement utilisables comme thérapie.

25 La capacité à augmenter le taux intracellulaire de GSH et également à régénérer ce tri-peptide dans des conditions de stress où des molécules de référence comme la NAC et la MEA sont inefficaces, est également très intéressante. Ces puissantes activités, anti-oxydante et probablement anti-apoptotique (si l'on considère que les éléments
30 radicalaires et le TNF- α jouent un rôle majeur dans ces processus délétères), sont en faveur d'un développement du composé I-152 dans d'autres situations non-infectieuses.

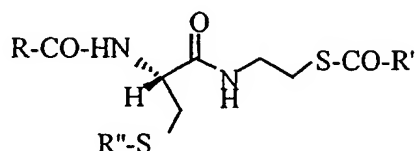
REFERENCES

- Abrams, 1991, Am. J. Med., 91, 106-112.
- 5 Barnett *et al.*, 1969, J. Amer. Chem. Soc., 91, 2358-2369.
- Bergamini *et al.*, 1994, J. Clin. Invest., 93, 2251-2257.
- Bosegaard *et al.*, 1993, J. Pharmacol. Exp. Ther. 265, 1239-1244.
- 10 Brückner *et al.*, 1989, J. Chromatogr. 476, 73-82.
- Figdor *et al.*, 1983, Cell. Biophys., 5, 105-118.
- 15 Griffith *et al.*, 1980, Anal Biochem., 106, 207-212.
- Heller *et al.*, 1997, Advances in Pharmacology, 38, 629-638.
- Herzenberg *et al.*, 1997, Proc. Natl. Acad. Sci., 94, 1967-1972.
- 20 Horowitz, 1991, Am. J. Med., 91, 113-117.
- Rabinovitch *et al.*, 1992, Diabetologie, 35, 409-413.
- 25 Rey *et al.*, 1984, Biochem. Biophys. Res. Comm., 121, 126-133.
- Volante, 1981, Tetrahedron Lett., 22, 3119-3122.
- Wieland et Bokelman, 1952, Ann. Chem. 576, 20-34.
- 30 Zee-cheng *et al.*, 1970, J. Med. Chem. 13, 414-418.

REVENDECATIONS

5

1/ Composés de formule générale:



(I)

dans laquelle :

- 10 - R et R' représentent indépendamment un radical alkyle en C₁-C₇,
linéaire ou ramifié, ou un groupe aryle non substitué ou substitué
par un ou plusieurs radicaux choisis parmi les halogènes, les
radicaux alkyles en C₁-C₃ linéaires ou ramifiés, et les radicaux -OH ;
- R'' est l'hydrogène ou un groupe CO-R¹ dans lequel R¹ est un radical
15 alkyle en C₁-C₇ linéaire ou ramifié, ou un groupe aryle non substitué
ou substitué par un ou plusieurs radicaux choisis parmi les
halogènes, les radicaux alkyles en C₁-C₃ linéaires ou ramifiés, et les
radicaux -OH ;

ainsi que les dimères formés par un pont disulfure à partir de l'un
20 et/ou l'autre des deux atomes de soufre des composés de formule
générale I constitué par les radicaux R" ou par les radicaux R'CO- des
deux molécules ainsi que les formes thiazolidines correspondantes.

2/ Composés selon la revendication 1 caractérisés en ce que R est un
25 groupe méthyle (-CH₃).

3/ Composés selon la revendication 2 caractérisés en ce que R' est un groupe méthyle (-CH₃).

4/ Composé selon la revendication 3 caractérisé en ce que R" est l'hydrogène (Composé N-(N-acétyl-L-cystéinyl)-S-acétylcystéamine).

5 5/ Composé selon la revendication 3 caractérisé en ce que R" est un groupe acétyle (-COCH₃) (Composé N-(N,S-Bis-acétyl-L-cystéinyl)-S-acétylcystéamine).

6/ Composé selon la revendication 3 caractérisé en ce que R" est un
10 groupe isobutyryle (-COCH(CH₃)₂) (Composé N-(N-acétyl-S-isobutyryl-L-cystéinyl)-S-acétylcystéamine).

7/ Composé selon la revendication 3 caractérisé en ce que R" est un
groupe pivaloyle (-COC(CH₃)₃) (Composé N-(N-acétyl-S-pivaloyl-L-
15 cystéinyl)-S-acétylcystéamine).

8/ Composé selon la revendication 2 caractérisé en ce que R' est sélectionné parmi le groupe isopropyle (-CH(CH₃)₂), tertibutyle (-C(CH₃)₃) et phényle (-C₆H₅).

20 9/ Composé selon la revendication 8 caractérisé en ce que R" est sélectionné parmi l'hydrogène (-H), le groupe acétyle (-COCH₃), le groupe isobutyryle (-COCH(CH₃)₂), le groupe pivaloyle (-COC(CH₃)₃), le groupe benzoyle (-CO-C₆H₅).

25 10/ Composés selon la revendication 1 caractérisés en ce que R est un groupe isopropyle (-CH(CH₃)₂).

11/ Composé selon la revendication 10 caractérisé en ce que R' est
30 sélectionné parmi le groupe méthyle (-CH₃), isopropyle (-CH(CH₃)₂), tertibutyle (-C(CH₃)₃) et phényle (-C₆H₅).

12/ Composé selon la revendication 11 caractérisé en ce que R" est sélectionné parmi l'hydrogène (-H), le groupe acétyle (-COCH₃), le groupe isobutyryle (-COCH(CH₃)₂), le groupe pivaloyle (-COC(CH₃)₃), le groupe benzoyle (-CO-C₆H₅).

5

13/ Composé selon la revendication 8 caractérisé en ce que R" est le groupe trityle.

14/ Composé selon la revendication 11 caractérisé en ce que R" est le
10 groupe trityle.

15/ Composé selon la revendication 1 à 14 caractérisé en ce qu'il est sous forme thiazolidine.

15 16/ Procédé de préparation d'un composé selon l'une quelconque des revendications 1 à 14 caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes:

a) Protection de la N-acyl-L-cystéine pour fournir le composé N-acyl-S-trityl-L-cystéine ; puis

20 b) Couplage de la N-acyl-S-trityl-L-cystéine protégée avec le chlorhydrate de S-acylcystéamine pour fournir le composé N-(N-acyl-S-trityl-L-cystéinyl)-S-acylcystéamine.

17/ Procédé de préparation d'un composé selon la revendication 15
25 caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

a) Protection de la N-acyl-L-cystéine pour fournir le composé N-acyl-S-trityl-L-cystéine ; puis

b) Couplage de la N-acyl-S-trityl-L-cystéine protégée avec la thiazolidine.

30

18/ Procédé selon les revendications 16 et 17 pour la préparation d'un composé selon les revendications 1 à 12 et 15 caractérisé en ce qu'il comprend en outre les étapes suivantes:

- c) Déprotection dudit composé obtenu à ladite étape b) ; puis
- 5 d) Libération du thiol libre de formule I.

19/ Procédé selon les revendications 16 et 18 pour la préparation du composé selon la revendication 4 caractérisé en ce que ledit composé N-acyl-S-trityl-L-cystéine de l'étape a) est le composé N-acétyl-S-trityl-L-
10 cystéine et que ledit chlorhydrate de S-acylcystéamine de l'étape b) est le chlorhydrate de S-acétylcystéamine.

20/ Procédé selon la revendication 18 pour la préparation d'un composé selon les revendications 1 à 3, 5 à 12 et 15 caractérisé en ce qu'il
15 comprend en outre une étape e) de S-acylation.

21/ Procédé de préparation d'un composé selon la revendication 1 dans lequel $R = R'$ et R'' est un hydrogène et caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes:

- 20 a) Estérification de la fonction carboxylique de la N-Boc-L-sérine (1) par la N-hydroxysuccinimide dans du N, N-diméthylformamide (DMF) en présence de 1,3-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) pour former l'ester actif (1'); puis,
- b) Condensation *in situ* de l'ester actif formé (1') avec l'éthanolamine
25 (2) pour fournir le composé N-(N-Boc-L-séryl)-2-aminoéthanol (3); puis,
- c) Réaction de Mitsunobu sur le composé (3) avec de la triphénylphosphine et du diisopropyl azodicarboxylate en présence d'acide thiocarboxylique dans le tétrahydrofurane pour fournir le
30 composé N-(N-Boc-S-acyl-L-cystéinyl)-S-acylcystéamine (4); puis,
- d) Déprotection du composé (4) avec l'acide trifluoroacétique.

22/ Procédé selon la revendication 21 pour la préparation du composé selon la revendication 4 caractérisé en ce que ledit acide thiocarboxylique de l'étape c) est l'acide thioacétique.

5 23/ Procédé de préparation des composés selon les revendications 1 à 3, 5 à 12 par S-acylation du composé de la revendication 4 en solution dans la pyridine en présence d'un anhydride R_2O ou d'un chlorure d'acide $R-Cl$ caractérisé en ce que R est choisi dans le groupe $CO-R^1$ dans lequel R^1 est un radical alkyle en C1-C7, linéaire ou ramifié ou un
10 groupe aryle substitué ou non par un ou plusieurs atomes d'halogènes.

24/ Procédé de préparation du composé selon la revendication 5 par S-acylation du composé de la revendication 4 en solution dans la pyridine en présence d'anhydride acétique.

15

25/ Procédé de préparation du composé selon la revendication 6 par S-acylation du composé de la revendication 4 en solution dans la pyridine en présence de chlorure d'isobutyryle.

20 26/ Procédé de préparation du composé selon la revendication 7 par S-acylation du composé de la revendication 4 en solution dans la pyridine en présence de chlorure de pivaloyle.

27/ Précurseur d'un composé intervenant dans la voie de biosynthèse
25 du glutathion caractérisé en ce qu'il s'agit d'un composé selon l'une quelconque des revendications 1 à 15.

28/ Utilisation des composés selon l'une quelconque des revendications 1 à 15 pour la préparation d'un produit intervenant dans la voie de
30 biosynthèse du glutathion.

29/ Utilisation selon la revendication 28 caractérisée en ce que ledit produit est choisi dans le groupe formé par la N-acétyl-L-cystéine, la cystéamine, la L-cystéine.

- 5 30/ Utilisation d'un composé selon l'une quelconque des revendications 1 à 15 en tant qu'agent antioxydant.

31/ Composé selon l'une des revendications 1 à 15 à titre de médicament.

10

32/ Composé selon l'une des revendications 1 à 15 à titre de médicament destiné à augmenter le taux intracellulaire et/ou extracellulaire de glutathion.

- 15 33/ Utilisation d'un composé selon l'une quelconque des revendications 1 à 15 pour la préparation de médicament destiné à augmenter le taux intracellulaire et/ou extracellulaire de glutathion.

- 20 34/ Composition pharmaceutique, notamment dermatologique, caractérisée en ce qu'elle comprend une quantité efficace d'un composé selon l'une des revendications 1 à 15 et un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

- 25 35/ Utilisation d'un composé selon l'une des revendications 1 à 15 pour la préparation d'un médicament ou d'une composition pharmaceutique selon la revendication 34 pour le traitement et/ou la prévention de pathologies ou de troubles liés à une déplétion en glutathion intra et/ou extracellulaire.

- 30 36/ Utilisation selon la revendication 35 caractérisée en ce que lesdites pathologies sont choisies parmi les infections virales, les infections bactériennes, les infections parasitaires, les maladies du tractus

respiratoire, les maladies neurodégénératives, les maladies auto-immunes, les maladies cardio-vasculaires, les cancers, les maladies du système immunitaire, le diabète, et de préférence le diabète de type I, les pathologies ophtalmiques, les maladies dermatologiques.

5

37/ Utilisation selon la revendication 36 caractérisée en ce que lesdites pathologies sont les infections virales.

38/ Utilisation selon les revendications 36 et 37 caractérisée en ce que
10 lesdites infections virales sont des infections causées par les virus à ADN et les virus à ARN, plus particulièrement par les virus rétroïdes, plus particulièrement le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) et de manière préférée le virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1).

15

39/ Utilisation selon les revendications 36 à 38 caractérisée en ce que ledit composé est le composé selon la revendication 4.

40/ Utilisation selon les revendications 36 à 38 caractérisée en ce que
20 ledit composé est le composé selon l'une des revendications 5 à 15.

41/ Composition pharmaceutique pour le traitement préventif et curatif du SIDA et des atteintes tissulaires associées caractérisée en ce qu'elle contient une quantité thérapeutiquement efficace d'un composé selon
25 les revendications 1 à 15 et un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

42/Produit comprenant au moins un composé selon l'une des revendications 1 à 15 et au moins un inhibiteur de la transcriptase
30 inverse comme produit de combinaison pour une utilisation simultanée, séparée ou étalée dans le temps en thérapie antivirale.

43/ Produit selon la revendication 42, caractérisée en ce que ledit inhibiteur de la transcriptase inverse est choisi par exemple parmi le 3'-azido-3'désoxythymidine (AZT), le 2',3'-didésoxyinosine (ddI), le 2',3'-didésoxycytidine (ddC), le (-)2',3'-didésoxy-3'-thiacytidine (3TC), le 2',3'-
5 didéshydro-2',3'didésoxythymidine (d4T) et le (-)2'-désoxy-5-fluoro-3'-thiacytidine (FTC), le TIBO, le HEPT, le TSAO, l' α -APA, la névirapine, le BAHF, l'acide phosphonoformique (PFA).

44/ Utilisation selon la revendication 35 caractérisée en ce que lesdites
10 pathologies sont des maladies cardio-vasculaires choisies de préférence parmi le groupe composé de l'hypertension artérielle, de l'artériosclérose, des ischémies cérébrales, des ischémies cardiaques, des arythmies ventriculaires, des fibrillations ventriculaires, de l'infarctus du myocarde.

15 45/ Utilisation selon la revendication 35 caractérisée en ce que lesdites pathologies sont les pathologies ophtalmiques, notamment la cataracte.

46/ Utilisation selon la revendication 35 caractérisée en ce que lesdites
20 pathologies sont des maladies du tractus respiratoire, notamment l'emphysème pulmonaire, la fibrose pulmonaire idiopathique, la mucoviscidose, la bronchite chronique, la bronchite aiguë, le syndrome de détresse respiratoire de l'adulte.

25 47/ Utilisation d'un composé selon l'une quelconque des revendications 1 à 15 pour la préparation d'un médicament ou d'une composition pharmaceutique selon la revendication 34 destinés au traitement préventif et/ou curatif des pertes auditives liées au bruit.

30 48/ Utilisation d'un composé selon l'une quelconques des revendications 1 à 15 pour la préparation d'un médicament ou d'une composition pharmaceutique selon la revendication 34 destinés au

traitement des empoisonnements liés à l'administration par voie orale ou parentérale, en surdose ou non, de substances choisies de préférence parmi le groupe composé de l'acétaminophène, les nitrites, l'éthanol, l'acrylonitrile, les métaux lourds et plus particulièrement l'or,
5 l'argent, le mercure.

49/ Utilisation selon la revendication 30 d'un composé selon l'une des revendications 1 à 15 dans le domaine de la cosmétique.

10 50/ Utilisation selon la revendication 49 pour:

- (i) prévenir, effacer et traiter les rides, les ridules de la peau; et/ou
- (ii) lutter contre le relâchement cutané et/ou sous cutané; et/ou
- (iii) améliorer la texture de la peau et raviver l'éclat de la peau; et/ou
- (iv) éliminer les poils indésirés de la peau; et/ou
- 15 (v) diminuer les tailles des pores de la peau; et/ou
- (vi) déformer en permanence les cheveux.

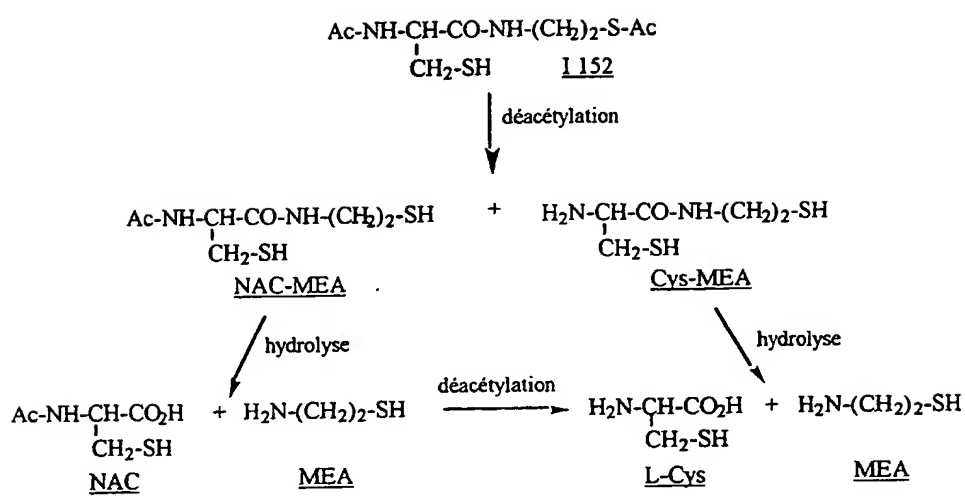
51/ Composition cosmétique pour le traitement de la peau et/ou des cheveux et/ou des poils caractérisée en ce qu'elle contient un composé
20 selon l'une des revendications 1 à 15 et un excipient cosmétiquement acceptable.

52/ Procédé de traitement cosmétique de la peau pour prévenir, effacer et traiter les rides, les ridules de la peau et/ou lutter contre le
25 relâchement cutané et/ou sous cutané et/ou améliorer la texture de la peau et raviver l'éclat de la peau et/ou éliminer les poils indésirés de la peau et/ou diminuer les tailles des pores de la peau comprenant l'application sur la peau d'une composition cosmétique selon la revendication 51.

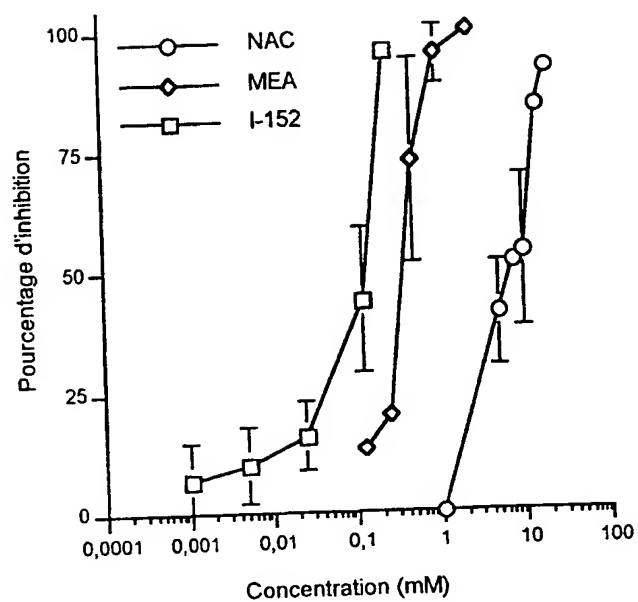
53/ Procédé de traitement cosmétique des cheveux pour la déformation permanente des cheveux, comprenant l'application sur les cheveux d'une composition cosmétique selon la revendication 51.

- 5 54/ Utilisation selon la revendication 30 dans l'industrie agroalimentaire et notamment pour la conservation des propriétés organoleptiques et nutritionnelles des boissons notamment des jus de fruit et/ou des aliments.

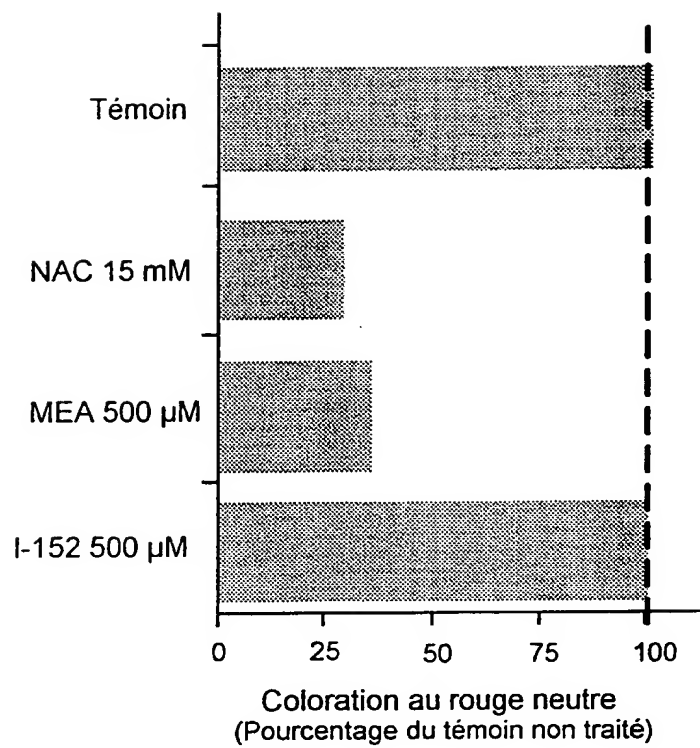
1/22

**FIG. 1**

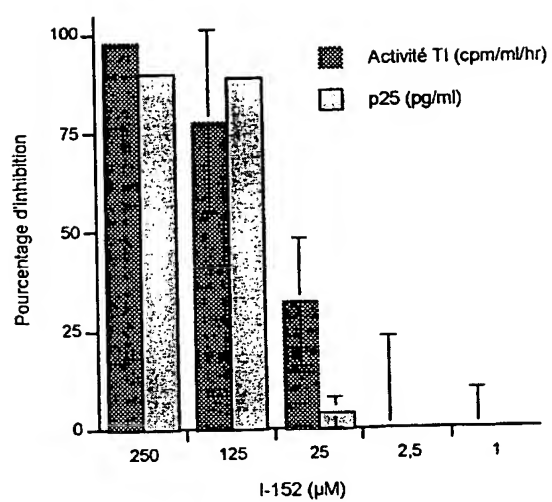
2/22

**FIG. 2**

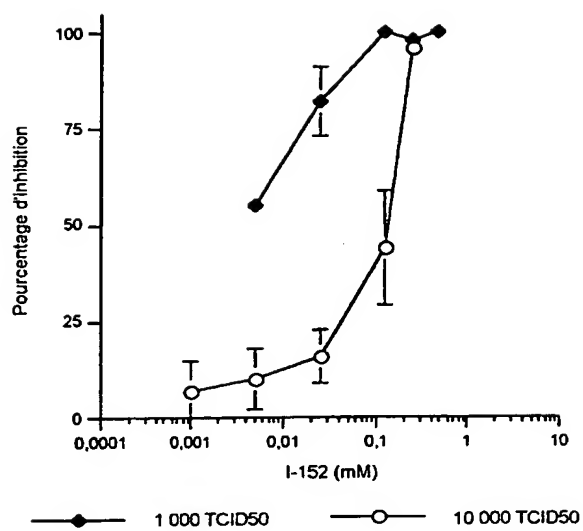
3/22

**FIG. 3**

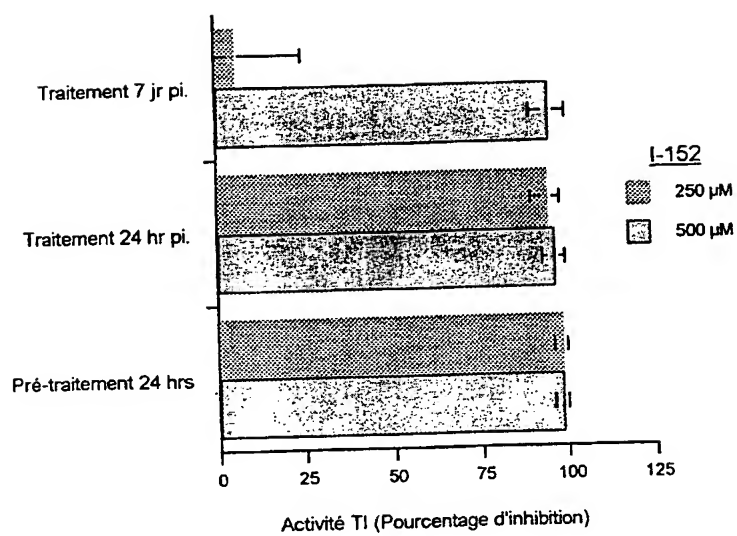
4/22

**FIG. 4**

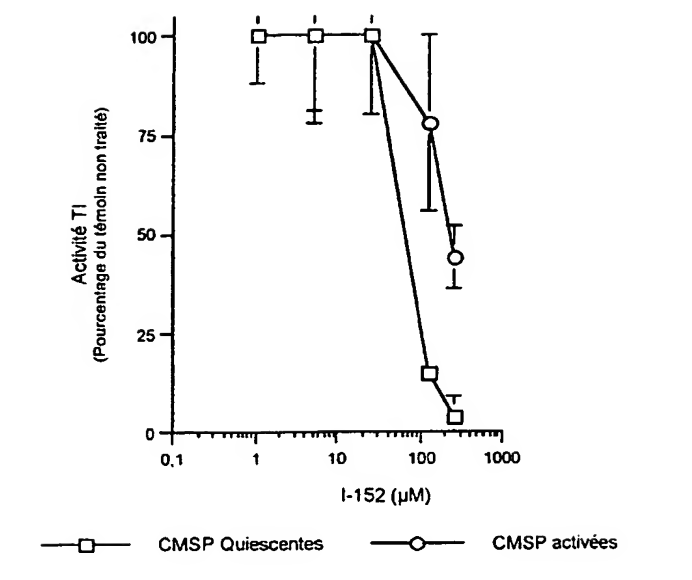
5/22

**FIG. 5**

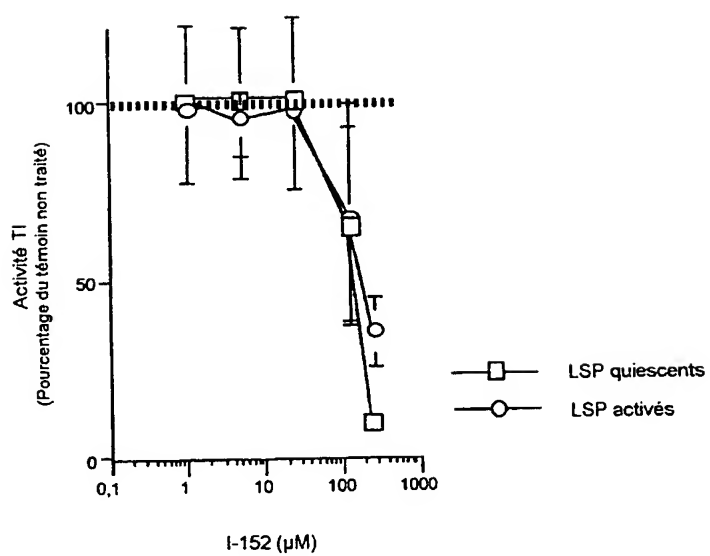
6/22

**FIG. 6**

7/22

**FIG. 7**

8/22

**FIG. 8**

9/22

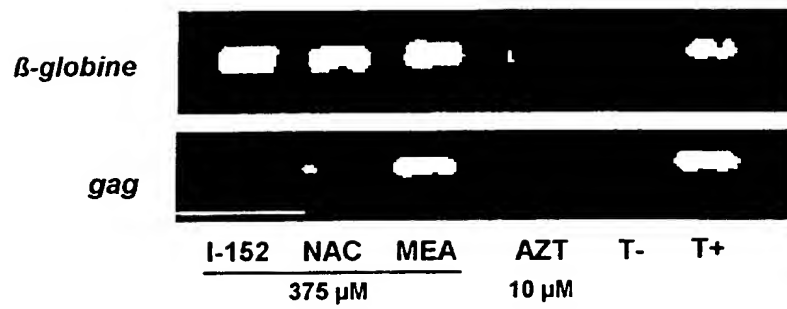
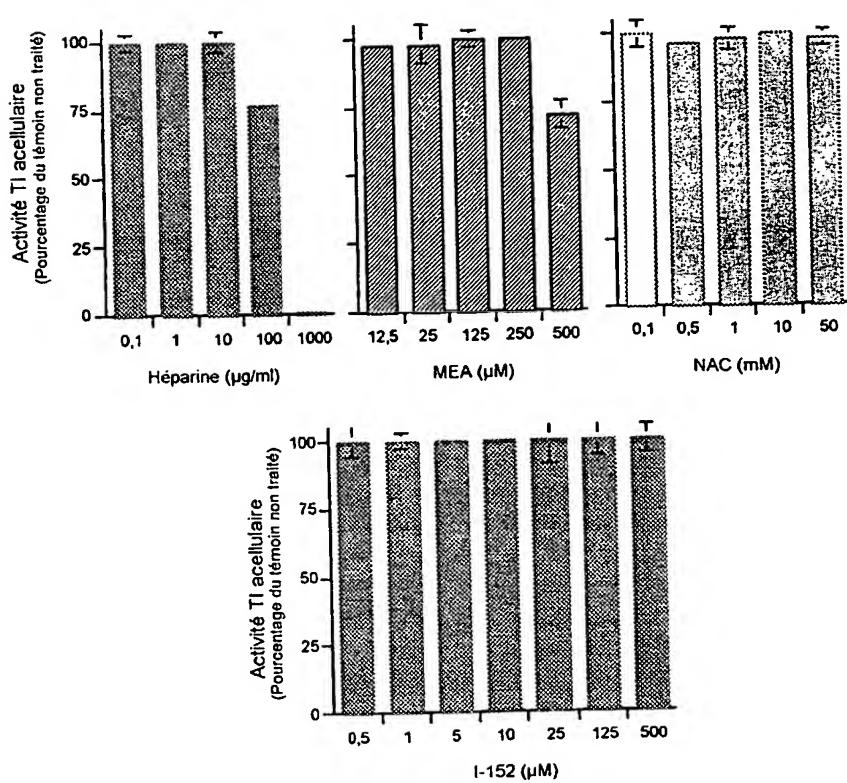
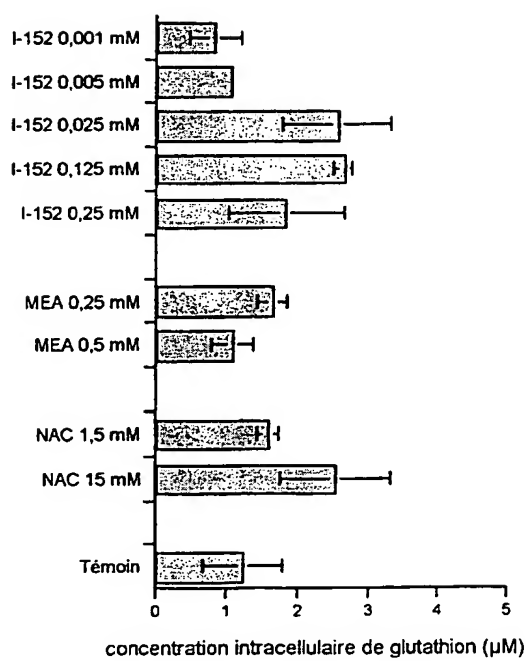


FIG. 9

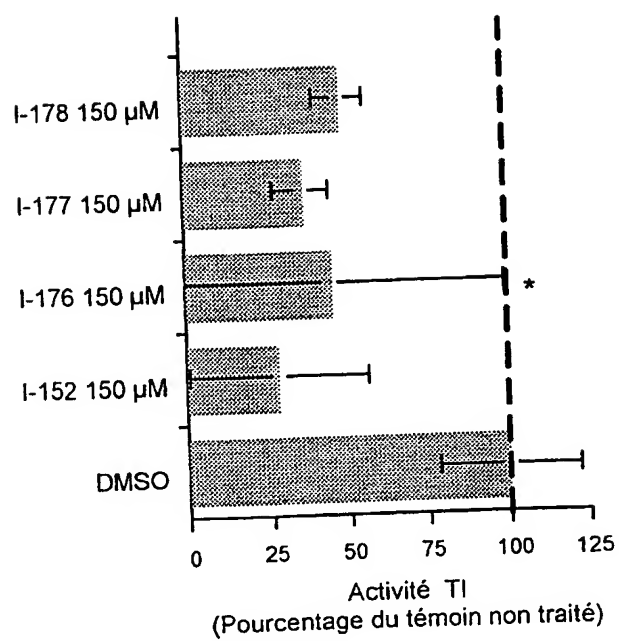
10/22

**FIG. 10**

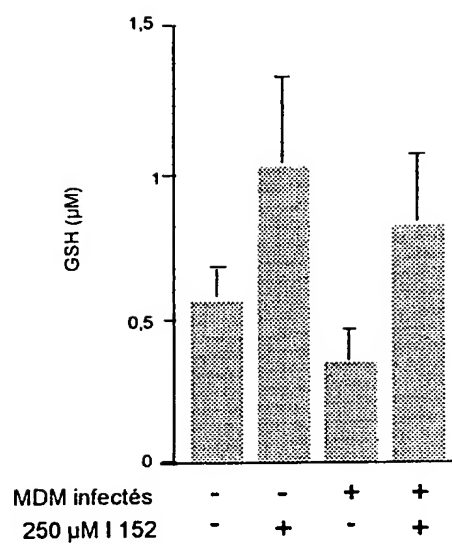
11/22

**FIG. 11**

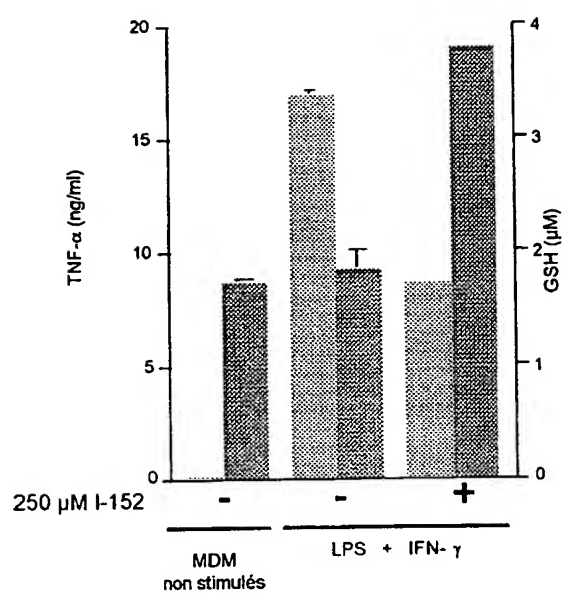
12/22

**FIG. 12**

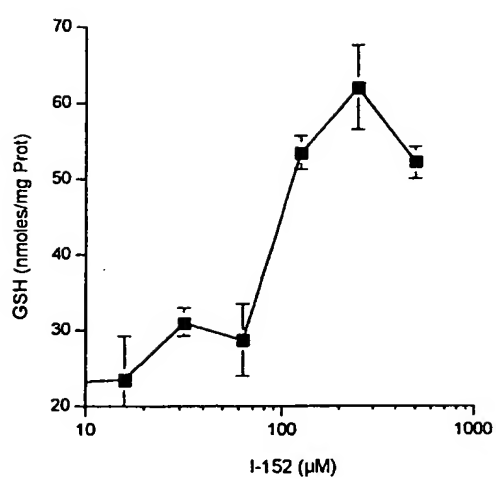
13/22

**FIG. 13**

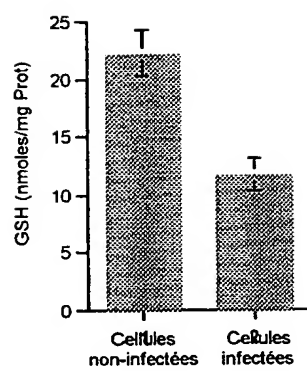
14/22

**FIG. 14**

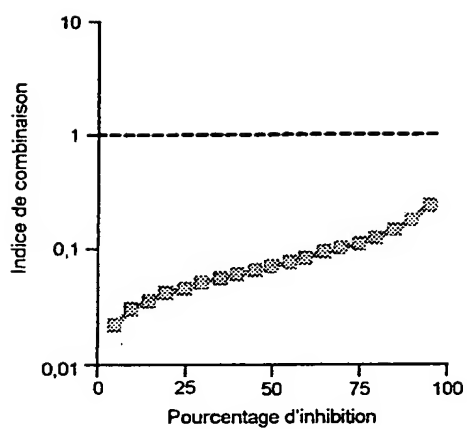
15/22

**FIG. 15**

16/22

**FIG. 16**

17/22

**FIG. 17**

18/22

TABLEAU I

mM	NAC	MEA	I-152
	Pré-Tt	Pré-Tt	Pré-Tt
DE50	9,4 mM	300 μ M	50 μ M
DE70	11 mM	400 μ M	100 μ M
DE90	14 mM	600 μ M	250 μ M

FIG. 18

20/22

TABLEAU III

(μ M)	I-152
DE50	38
DE70	54
DE90	97

FIG. 20

21/22

TABLEAU IV

(μ M)	I-152	I-188	I-189	I-192	I-193
DE50	35	109	43	166	146
DE70	45	176	54	204	186
DE90	66	381	78	283	272

FIG. 21

22/22

TABLEAU V

(μ M)	I-152	I-203	I-204	I-207	I-208	I-209
DE50	43	74	74	43	36	51
DE70	68	93	91	62	50	71
DE90	141	132	127	112	88	118

FIG. 22

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 00/01447

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C07C327/30 C07C327/34 A61K31/265 A61P31/18 A61K7/06
A61K7/48

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07C A61K A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5 624 955 A (H.T. NAGASAWA, ET AL.) 29 April 1997 (1997-04-29) column 3	1,28,32
A	WO 92 21368 A (LIFE SCIENCES' TECHNOLOGIES) 10 December 1992 (1992-12-10) cited in the application page 2 -page 5	1,28,32
A	WO 95 10268 A (J.G. THOENE) 20 April 1995 (1995-04-20) cited in the application page 3 -page 4; claim 1	1,28,32
	--- -/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

& document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

12 October 2000

Date of mailing of the international search report

03/11/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

English, R

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 00/01447

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 4 927 808 A (S. KITAHARA, ET AL.) 22 May 1990 (1990-05-22) cited in the application column 1 -column 2	1,28,32
A	US 5 580 577 A (L.A. HERZENBERG, ET AL.) 3 December 1996 (1996-12-03) cited in the application column 1 -column 2	1,28,32

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Intern 1st Application No

PCT/FR 00/01447

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5624955 A	29-04-1997	NONE	
WO 9221368 A	10-12-1992	US 5977073 A AU 2187992 A DE 69230796 D EP 0604433 A	02-11-1999 08-01-1993 20-04-2000 06-07-1994
WO 9510268 A	20-04-1995	AU 7931094 A CA 2173964 A EP 0789565 A US 5646189 A US 5725870 A	04-05-1995 20-04-1995 20-08-1997 08-07-1997 10-03-1998
US 4927808 A	22-05-1990	DE 3784905 A DE 3784905 D DE 3784905 T EP 0276317 A WO 8800182 A KR 9106633 B	22-04-1993 22-04-1993 05-08-1993 03-08-1988 14-01-1988 29-08-1991
US 5580577 A	03-12-1996	NONE	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem: Internationale No
PCT/FR 00/01447

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE CIB 7 C07C327/30 C07C327/34 A61K31/265 A61P31/18 A61K7/06 A61K7/48		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou a la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 7 C07C A61K A61P		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	US 5 624 955 A (H.T. NAGASAWA, ET AL.) 29 avril 1997 (1997-04-29) colonne 3	1,28,32
A	WO 92 21368 A (LIFE SCIENCES' TECHNOLOGIES) 10 décembre 1992 (1992-12-10) cité dans la demande page 2 -page 5	1,28,32
A	WO 95 10268 A (J.G. THOENE) 20 avril 1995 (1995-04-20) cité dans la demande page 3 -page 4; revendication 1 -/--	1,28,32
<input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe		
* Catégories spéciales de documents cités: "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier "Z" document qui fait partie de la même famille de brevets		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée 12 octobre 2000		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale 03/11/2000
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl. Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé English, R

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No
PCT/FR 00/01447

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	US 4 927 808 A (S. KITAHARA, ET AL.) 22 mai 1990 (1990-05-22) cité dans la demande colonne 1 -colonne 2 ---	1,28,32
A	US 5 580 577 A (L.A. HERZENBERG, ET AL.) 3 décembre 1996 (1996-12-03) cité dans la demande colonne 1 -colonne 2 -----	1,28,32

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Dem: Internationale No

PCT/FR 00/01447

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 5624955 A	29-04-1997	AUCUN	
WO 9221368 A	10-12-1992	US 5977073 A AU 2187992 A DE 69230796 D EP 0604433 A	02-11-1999 08-01-1993 20-04-2000 06-07-1994
WO 9510268 A	20-04-1995	AU 7931094 A CA 2173964 A EP 0789565 A US 5646189 A US 5725870 A	04-05-1995 20-04-1995 20-08-1997 08-07-1997 10-03-1998
US 4927808 A	22-05-1990	DE 3784905 A DE 3784905 D DE 3784905 T EP 0276317 A WO 8800182 A KR 9106633 B	22-04-1993 22-04-1993 05-08-1993 03-08-1988 14-01-1988 29-08-1991
US 5580577 A	03-12-1996	AUCUN	

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)